









636.39,082,451

# AKADEMIA ROLNICZA W SZCZECINIE

## WYDZIAŁ BIOTECHNOLOGII I HODOWLI ZWIERZĄT

Barbara Błaszczuk

### RÓŻNICE SEZONOWE W DYNAMICE ZMIAN STĘŻEŃ HORMONÓW PŁCIOWYCH I WYBRANYCH PARAMETRÓW BIOCHEMICZNYCH KRWI U KÓZ ANGLO-NUBIJSKICH W OKRESIE SYNCHRONIZOWANEJ RUI

D-1042



WPM: 5937

Praca doktorska wykonana  
w Zakładzie Rozrodu Zwierząt  
pod kierunkiem naukowym  
**Dr hab. Jana Udały, prof. nadzw.**

AKADEMIA ROLNICZA W SZCZECINIE

WYDZIAŁ BIOTECHNOLOGII  
I HODOWLI ZWIERZĄT

Barbara Blaszczyk



C2-D.59021

D-110117  
X  
Wpł. 14.12.16

Praca doktorska wykonana  
w Zakładzie Rozrodu Zwierząt  
pod kierunkiem naukowym  
Dr hab. Jana Udały, prof. nadzw.

D. 145 / 2016

Pragnę gorąco podziękować  
Panu mgr Alicji Kierzek,  
Pani dr Katarzynie Kaminowicz – Dardzińskiej,  
Pani dr Stanisławie Urbańskiej,  
Pani dr Mariannie Sytańskiej  
za przychylną i pomocną współpracę.

Wyraz podziękowania składam również  
Janowi Kuchlińskiemu, Wiesławie Łachowicz, Teresie Adamczak,  
Janowi Wójcickiemu, Janinie Białobłockiej za okazaną mi  
życzliwość i pomoc.

Serdeczne podziękowania pragnę wyrazić  
Panu Profesorowi Janowi Udale  
za umożliwienie wykonania niniejszej pracy,  
za życzliwość i wsparcie naukowe.





*Pragne gorąco podziękować  
Pani mgr Alicji Kierzek,  
Pani dr Katarzynie Romanowicz – Barcikowskiej,  
Panu dr Stanisławowi Urbańskiemu,  
Panu dr Marianowi Syrkowi  
za przychylność i pomoc w wykonaniu badań.*

*Wyrazy podziękowania składam moim Koleżankom:  
Iwone Kosickiej, Wiolecie Lachowicz, Bożenie Mianowskiej,  
Iwone Wegners i Iwone Błaszczuk za okazaną mi  
życzliwość i pomoc.*

*Szczególne wyrazy wdzięczności składam Dariuszowi  
Gączarzewiczowi, od którego znacząca pomoc uzyskałam  
na każdym etapie powstawania niniejszej pracy.*

*Podziękowania należą się również mojej Mamie, bez  
której wsparcia praca ta nigdy by nie powstała.*



# SPIS TREŚCI

I. WSTĘP.....	1
II. PRZEGLĄD PIŚMIENICTWA.....	2
1. MECHANIZMY REGULUJĄCE PRZEBIEG CYKLU RUIOWEGO.....	2
1.1. REGULACJA NA POZIOMIE OŚRODKOWEGO UKŁADU NERWOWEGO.....	2
1.2. REGULACJA NA POZIOMIE JAJNIKA.....	7
1.3. STERODYDNEJĘZA PECHERZYLOWA.....	15
2. MORFOLOGICZNE I FUNKCJONALNE ZMIANY TOWARZYSZĄCE OWULACJI.....	19
3. MONITOROWANIE OWULACJI.....	24
4. SEZONOWOŚĆ W ROZRODZIE.....	27
5. SYNCHRONIZACJA RUI.....	28
III. CEL PRACY.....	36
IV. MATERIAŁ I METODY.....	37
1. OGÓLNA CHARAKTERYSTYKA FERMY I UTRZYMANIE ZWIERZĄT.....	37
2. TERMIN I HARMONOGRAM DOŚWIĄCZENIA.....	38
2.1. SYNCHRONIZACJA I WYWOŁANIE RUI.....	40
2.2. SCHEMAT POKIERANIA KRWI.....	40
3. BADANIE PARAMETRY KRWI.....	41
3.1. OZNACZANIE STĘŻEŃ HORMONÓW.....	43
3.2. OZNACZANIE STĘŻEŃ CYCLOSTEROIDU, OLIGOKSY I GEPH3 I GEPH4 JAKO LECZY URIDOCYTOW.....	44
4. BADANIE LAPAROSKOPOWE.....	45
5. BADANIA STATYSTYCZNE.....	46
V. WYNIKI.....	47
1. CZAS WYSTĄPIENIA RUI.....	47
2. ZMIANY STĘŻEŃ PROGESTYRONU.....	47
3. ZMIANY STĘŻEŃ ESTRADIOLU.....	49
4. ZMIANY STĘŻEŃ LUTEALINY.....	50
5. ZMIANY STĘŻEŃ NIKLAKTYNY.....	54
6. ZMIANY STĘŻEŃ GLEKOCYTOW.....	59
7. ZMIANY STĘŻEŃ TRILIBINY.....	61
8. ZMIANY STĘŻEŃ MELATONINY.....	62
9. ZMIANY STĘŻEŃ CYCLOSTEROIDU.....	64
10. ZMIANY LECZY URIDOCYTOW.....	65
11. ZAŁIŻENOCI PŁYNNICY W ZDANIACH PARAFERMALE.....	68
12. OBSERWACJA LAPAROSKOPOWA JAJNIKÓW I CIĄŻELNIKÓW ZASO OWULACJI.....	69
VI. OMÓWIENIE WYNIKÓW.....	71
VII. WNIOSKI.....	93
VIII. PIŚMIENICTWO.....	96

**„Życie to wzajemne powiązanie  
cząsteczek, a nie właściwość  
jakiegokolwiek pojedynczej  
cząsteczki”**

*Linus Pauling*



# SPIS TREŚCI

<b>I. WSTĘP</b> .....	1
<b>II. PRZEGLĄD PIŚMIENNICTWA</b> .....	2
1. MECHANIZMY REGULUJĄCE PRZEBIEG CYKLU RUJOWEGO.....	2
1.1. REGULACJA NA POZIOMIE OŚRODKOWEGO UKŁADU NERWOWEGO.....	2
1.2. REGULACJA NA POZIOMIE JAJNIKA.....	7
1.3. STEROIDOGENEZA PĘCHERZYKOWA.....	15
2. MORFOLOGICZNE I FUNKCJONALNE ZMIANY TOWARZYSZĄCE OWULACJI.....	19
3. MONITOROWANIE OWULACJI.....	24
4. SEZONOWOŚĆ W ROZRODZIE.....	27
5. SYNCHRONIZACJA RUI.....	33
<b>III. CEL PRACY</b> .....	36
<b>IV. MATERIAŁ I METODY</b> .....	37
1. OGÓLNA CHARAKTERYSTYKA FERMY I UTRZYMANIE ZWIERZĄT.....	37
2. TERMIN I HARMONOGRAM DOŚWIADCZENIA.....	38
2.3. SYNCHRONIZACJA I WYWOŁANIE RUI.....	40
2.2. SCHEMAT POBIERANIA KRWI.....	40
3. BADANE PARAMETRY KRWI.....	41
3.1. OZNACZANIE STĘŻEŃ HORMONÓW.....	41
3.2. OZNACZANIE STĘŻEŃ CHOLESTEROLU, GLUKOZY I OKREŚLENIE LICZBY LEUKOCYTÓW....	44
4. BADANIE LAPAROSKOPOWE.....	45
5. BADANIA STATYSTYCZNE.....	46
<b>V. WYNIKI</b> .....	47
1. CZAS WYSTĄPIENIA RUI.....	47
2. ZMIANY STĘŻEŃ PROGESTERONU.....	47
3. ZMIANY STĘŻEŃ ESTRADIOLU.....	49
4. ZMIANY STĘŻEŃ LUTROPINY.....	50
5. ZMIANY STĘŻEŃ PROLAKTINY.....	54
6. ZMIANY STĘŻEŃ GLUKOZY.....	59
7. ZMIANY STĘŻEŃ TYROKSYNY.....	61
8. ZMIANY STĘŻEŃ MELATONINY.....	63
9. ZMIANY STĘŻEŃ CHOLESTEROLU.....	64
10. ZMIANY LICZBY LEUKOCYTÓW.....	66
11. ZALEŻNOŚCI POMIĘDZY BADANYMI PARAMETRAMI.....	68
12. OBSERWACJA LAPAROSKOPOWA JAJNIKÓW I OKREŚLENIE CZASU OWULACJI.....	69
<b>VI. OMÓWIENIE WYNIKÓW</b> .....	77
<b>VII. WNIOSKI</b> .....	95
<b>VIII. PIŚMIENNICTWO</b> .....	96

## I. WSTĘP

Spośród zwierząt gospodarskich hodowanych w naszym kraju kozy zajmują szczególne miejsce. Przez wiele lat wokół tego gatunku panował nieprzychylny klimat i dopiero w ostatnich czasach, w „dobie mody na zdrową żywność”, kiedy zaczęto doceniać niezwykle walory koziego mleka, zwierzęta te powróciły do łask. Obecnie obserwuje się wzrastające zainteresowanie chowem kóz, co wiąże się z potrzebą doskonalenia metod hodowlanych, w których na pierwsze miejsce wysuwają się prace związane z użytkowością rozplodową. W centrum uwagi znajdują się zwłaszcza te, które zakładają synchronizację rui w sezonie i poza sezonem rozrodczym. Stwarza to możliwość równomiernej produkcji mleka w ciągu roku, decydując tym samym o ekonomicznej stronie hodowli kóz.

Osiągnięcia współczesnej endokrynologii pozwalają na efektywne sterowanie cyklem rujowym samic, ale reakcja kóz hodowanych w naszych warunkach klimatycznych na stymulację hormonalną nie jest dostatecznie poznana. Dodatkową barierą jest występowanie zjawiska sezonowości w rozrodzie. W związku z tym wywołanie rui i owulacji w okresie anestrалnym może być utrudnione. W tej sytuacji celowym wydaje się kontynuowanie badań nad dokładniejszym poznaniem zjawisk zachodzących w czasie stymulowanej rui w sezonie i poza sezonem rozrodczym. O możliwościach wdrażania stosowanej metody decyduje bowiem znajomość zachodzących zmian hormonalnych. Należy jednak uwzględnić, że sama analiza dynamiki sekrecyjnej hormonów płciowych nie daje pełnej oceny przebiegu okresu okołowulacyjnego. Owulacja jest bowiem okresem intensywnych przemian związanych ze złożonym i nie w pełni poznany oddziaływaniem hormonów płciowych i innych wskaźników fizjologicznych na organizm. Celem tych zmian jest nie tylko uwolnienie komórki jajowej, ale również stworzenie warunków do jej zapłodnienia i przygotowanie organizmu do utrzymania ewentualnej ciąży. Dlatego też uzasadnionym wydaje się analiza przynajmniej niektórych wskaźników biochemicznych mogących odzwierciedlać stan metaboliczny organizmu w czasie owulacji.

## II. PRZEGLĄD PIŚMIENICTWA

### 1. MECHANIZMY REGULUJĄCE CYKL RUJOWY

#### 1.1. REGULACJA NA POZIOMIE OŚRODKOWEGO UKŁADU NERWOWEGO

Charakterystyczną cechą cyklu rujowego jest kompleks powtarzających się w określonych odstępach czasu zmian hormonalnych, zsynchronizowanych ze zmianami morfologicznymi, biochemicznymi, immunologicznymi i behawioralnymi, związanymi z przygotowaniem organizmu samicy do owulacji, zapłodnienia i utrzymania ewentualnej ciąży. Zmiany obserwowane w cyklu rujowym są ściśle powiązane z czynnością jajnika, a także wyższych ośrodków na poziomie podwzgórza i przysadki mózgowej, które sterują i nadzorują tę czynność. Pomiedzy podwzgórzem, przysadką i jajnikiem wytwarzają się dodatnie i ujemne sprzężenia zwrotne stanowiące istotny element regulujący czynność całej osi.

Rola ośrodkowego układu nerwowego w głównej mierze polega na „analizie” sygnałów płynących ze środowiska zewnętrznego informujących o warunkach panujących w otoczeniu. Spośród czynników środowiskowych wpływających na rozród kóz ras klimatu umiarkowanego istotną rolę przypisuje się długości dnia świetlnego, podczas gdy na rozród kóz ras klimatu tropikalnego większy wpływ mają zmiany w wysokości opadów związane z wegetacją roślin [92]. Ważnym sygnałem odbieranym z otoczenia jest również obecność kozłów, które wydzielając feromony działają pobudzająco na aktywność płciową samic. Drugim źródłem informacji płynących do ośrodkowego układu nerwowego jest wnętrze organizmu. Z licznych interoreceptorów monitorujących stan środowiska wewnętrznego docierają sygnały mówiące o warunkach tlenowych w organizmie, ciśnieniu, składzie jonowym, poziomie substratów energetycznych, stężeniu hormonów i innych czynników wpływających na stan organizmu. W podwzgórz, które jest centrum regulacji homeostazy, dokonuje się analiza i integracja tych informacji, pośrednio bądź bezpośrednio wpływających na rozród [22].

Nadrzędną rolę w regulacji całej osi podwzgórze-przysadka-jajnik odgrywają podwzgórzowe neurony wydzielające gonadoliberynę (GnRH) [113]. U owiec ciała neuronów, w których odbywa się synteza tego neuropeptydu zlokalizowane są przede

wszystkim w obszarze przedwzrokowym (*preoptic area*) i przednim podwzgórzu (*anterior hypothalamus*) [91]. Część neuronów GnRH ma swoje zakończenia w układzie limbicznym i śródmózgowiu. W układzie limbicznym dokonuje się ocena sygnałów środowiskowych, natomiast śródmózgowie pełni nadrzędną rolę w kontroli behawioru zwierząt, w tym również zachowań seksualnych.

Jednakże największa ilość neuronów prowadzi swe aksony do wyniosłości pośrodkowej podwzgórza (*eminentia mediana*), gdzie neurohormon uwalniany jest do naczyń żylnych podwzgórzowo-przysadkowego układu wrotnego, oddziaływując na komórki gruczołowe przysadki. Początkowo uważano, że jedynym kierunkiem przepływu krwi w krążeniu wrotnym jest droga od podwzgórza do przysadki. Obecnie wiadomo, że istnieją ścisłe połączenia pomiędzy przednim i tylnym płatem przysadki, między naczyniami wyniosłości pośrodkowej, a siecią naczyń w odległych częściach mózgu oraz, że istnieje wsteczny przepływ krwi wrotnej od przysadki do podwzgórza umożliwiający transport hormonów tropowych w okolicę jąder podwzgórza. Istotną funkcję pełni również okołoprzysadkowy kompleks naczyniowy umożliwiający lokalną wymianę przeciwprądową [84].

Komórkami docelowymi dla GnRH są gonadotropy przysadki, które z kolei wydzielają do krwi gonadotropiny działające na jajnik. Charakterystyczną cechą wydzielania GnRH jest uwalnianie pulsacyjne (epizodyczne), występujące w określonych przedziałach czasowych. Kluczową rolę w tym procesie spełnia generator pulsów GnRH znajdujący się w brzuszno-przyśrodkowym podwzgórzu [91]. Reguluje on epizodyczne uwalnianie GnRH do przysadkowego krążenia wrotnego, a tym samym moduluje pulsacyjne wydzielanie lutropiny (LH). Wydaje się jednak, że uwalnianie drugiej gonadotropiny przysadkowej - folitropiny (FSH), nie jest całkowicie zależne od pulsacyjnego uwalniania GnRH. Wydzielanie FSH jest bowiem niezgodne z pulsami wydzielniczymi LH. Ta niezgodność może wynikać z selektywnego hamowania FSH przez inhibinę, odmiennej wrażliwości komórek gonadotropowych na GnRH bądź dłuższego okresu półtrwania folitropiny od lutropiny. Nie można też wykluczyć istnienia innych neurohormonów pobudzających głównie wydzielanie FSH. Za taką hipotezą przemawiają wyniki doświadczeń przeprowadzonych na owcach, u których podawanie związku o działaniu antagonistycznym do GnRH nie zmieniało podstawowego stężenia FSH [35]. Natomiast wpływ generatora pulsu GnRH na pulsacyjne uwalnianie LH jest niezaprzeczalny i przez to uważany jest za wyznacznik czynności cyklicznej jajnika.



W doświadczeniach na kozach, polegających na rejestrowaniu zmian aktywności generatora wykazano zmiany częstotliwości i amplitudy pulsów GnRH i LH w zależności od fazy cyklu rujowego i sprzężeń zwrotnych ze steroidami [153, 154]. Zanotowano obniżoną częstotliwość pulsów GnRH i LH w fazie lutealnej przy jednoczesnym wzroście amplitudy, natomiast w fazie folikularnej wzrost częstotliwości z obniżoną amplitudą, za wyjątkiem przedowulacyjnej fali LH. Jak podają Tanaka i wsp. [154] wzmagana aktywność generatora pulsu następująca po luteolizie promuje pęcherzykowy rozwój, a przez to stymuluje sekrecję estradiolu, który w okresie przedowulacyjnym indukuje falę LH. Początkowo uważano, że estradiol wpływa na przedowulacyjny wyrzut LH jedynie poprzez wzmaganie przysadkowej odpowiedzi na GnRH. Wyniki Moentera i wsp. [112] pozwalają jednak sądzić, iż estradiol indukuje falę LH również na poziomie podwzgórza. Wymienieni badacze podając estradiol owariotomizowanym owcom, w sposób stymulujący fazę pęcherzykową, zanotowali bowiem wystąpienie silnej fali GnRH. Sugeruje się jednakże, że w indukcji przedowulacyjnej fali LH przez estradiol na poziomie podwzgórza uczestniczy inny ośrodkowy mechanizm kontrolujący uwalnianie GnRH niż aktywność generatora pulsu [154]. Godnym uwagi jest również fakt, że przedowulacyjna fala LH rozpoczynająca się zbieżnie z falą GnRH, kończy się szybciej mimo utrzymującego się wysokiego stężenia GnRH w obszarze przysadkowym [112]. Okada i wsp. [119] wskazują na związek wydłużonej fali GnRH z kontrolą rujowego zachowania, a w szczególności z odruchem tolerancji i gotowością do krycia. Wymienieni badacze uważają, że estradiol nie tylko indukuje falę LH, ale poprzez wpływ na neurony GnRH, pobudza centralny system nerwowy regulujący behawior seksualny.

Mając na uwadze istotny wpływ steroidowych hormonów płciowych na regulację tonicznego i pulsacyjnego wydzielania GnRH należy uwzględnić, iż tylko bardzo nieliczna subpopulacja neuronów GnRH posiada receptory estrogenowe i progesteronowe. Dlatego hormony jajnikowe wymagają pośrednictwa innych układów neurotransmisyjnych pobudzających bądź hamujących syntezę i uwalnianie GnRH. Stwierdzono, że neurony GABA-ergiczne (kwas gamma aminomasłowy), które mają kontakt synaptyczny z neuronami GnRH, zawierają receptory dla estrogenów i wywierają hamujący wpływ na syntezę tej gonadoliberyny [154]. W reakcji ujemnego sprzężenia zwrotnego ze steroidami, czyli w hamowaniu wydzielania GnRH, pośredniczą również neurony produkujące endogenne opiody. Z dostępnych danych wynika, że na syntezę i wydzielanie gonadoliberyny opiody mogą działać

bezpośrednio przez wpływ na neurony GnRH, bądź za pośrednictwem neuronów dopalub noradrenergicznych. Uważa się na przykład, że  $\beta$ -endorfina wywiera represyjny wpływ na uwalnianie GnRH poprzez hamowanie wydzielania noradrenaliny do przestrzeni synaptycznej [110]. W mechanizm działania generatora pulsów GnRH włączone są również takie neurotransmitery jak serotonina, neuropeptyd Y i substancja P mogące zarówno hamować jak i stymulować uwalnianie GnRH. Oprócz tego istnieją dane wskazujące, że w kontakcie między neuronami uczestniczy tlenek azotu [73]. Wpływa on na funkcję niektórych klasycznych neuroprzekaźników w mózgu, a głównie na układ dopaminergiczny i noradrenergiczny [158]. Badania wykonane na szczurach sugerują na występowanie zależności pomiędzy uwalnianiem tlenu azotu w środkowym obszarze przedwzrokowym a aktywacją steroidozależnych systemów neuronalnych odpowiedzialnych za sekrecję GnRH [128]. Ponadto wydaje się, że tlenek azotu bezpośrednio bądź pośrednio poprzez układ dopaminergiczny moduluje metabolizm glukozy w mózgu [147].

Wiadomo, że glukoza jest głównym źródłem energii dla tkanki mózgowej. W świetle badań ostatnich lat dostępność glukozy jest również istotnym czynnikiem w utrzymaniu elektrycznej aktywności generatora pulsu GnRH. I chociaż w dostępnej literaturze brak jest danych o wpływie glukozy na pulsacyjne wydzielanie GnRH i LH u kóz, to na podstawie badań przeprowadzonych u innych gatunków zwierząt można sądzić, że jest on podobny. He i wsp. [62] indukując hipoglikemię u szczurów przez podanie insuliny wykazali tłumienie pulsacyjnego wydzielania LH i obniżenie aktywności generatora pulsu GnRH, która była szybko przywracana przez podanie glukozy. Również fruktoza tłumiała represyjny wpływ hipoglikemii, ale efekt ten następował z pewnym opóźnieniem. Natomiast iniekcja mleczanu nie przywracała pulsacyjnego wydzielania GnRH. Mając na uwadze bardzo szybką odpowiedź aktywności generatora pulsu na podanie glukozy, cytowani autorzy wskazują, że glukoza działa bezpośrednio przenikając barierę krew-mózg, natomiast fruktoza dopiero po przekształceniu w glukozę.

O wyraźnej roli glukozy w regulacji neurohormonalnej świadczą także badania polegające na farmakologicznej blokadzie metabolizmu glukozy u szczurów przez podanie 2-dezoksyglukozy (2-GD), która nie tylko tłumii pulsacyjne uwalnianie GnRH, ale również obniża ilość neuronów GnRH w podwzgórzu [21].

Regulacyjny wpływ glukozy na wydzielanie LH na poziomie podwzgórzowych neuronów GnRH stwierdzono także w badaniach doświadczalnych na owcach [24].

---

Medina i wsp. [107] wykazali z kolei, że niedobór glukozy we krwi hamuje u tego gatunku zwierząt zarówno pulsacyjne jak i toniczne uwalnianie LH. Sugeruje to, iż w mechanizm tonicznego wydzielania LH włączona jest wrażliwość neuronów GnRH na dostępność glukozy. Powyżsi autorzy nie wykluczają, że brak glukozy tłumia przedowulacyjną falę LH przez redukcję receptorów estrogennych w podwzgórze.

Chociaż znaczna część badań dotycząca wpływu glukozy na wydzielanie GnRH i LH nie wyjaśnia mechanizmów regulujących tym złożonym procesem, większość badaczy jest zgodna, że uczestniczą w nim centralnie działające neurotransmitery takie jak endogenne opioidy [21, 107, 156] czy noradrenalina [115]. Nie wyklucza się również, iż niedostateczny poziom glukozy może hamować uwalnianie GnRH poprzez kortykoliberynę (CRH) tłumiącą za pośrednictwem  $\beta$ -endorfiny sekrecję gonadoliberyny i lutropiny [156].

Przedstawione dane wskazują jak istotną rolę pełni glukoza w regulacji prawidłowej funkcji neurosekrecyjnej podwzgórze. Należy jednak uwzględnić, że są to wyniki uzyskane w warunkach eksperymentalnych, w których dostępność glukozy była zredukowana farmakologicznie do poziomu hipoglikemii, a więc do poziomu obserwowanego w głodzeniu, wyczerpaniu czy w stanach patologicznych. W warunkach fizjologicznych normalny model uwalniania LH trwa tak długo jak długo zwierzę może utrzymać normalne stężenie glukozy we krwi. W momencie kiedy dopływ energii jest ograniczony bądź zwiększone jest jej zużycie, poziom glukozy utrzymywany jest przez mobilizację rezerw organizmu. Nie można zatem wnioskować, że podawanie glukozy w warunkach fizjologicznych będzie wzmagало aktywność elektryczną generatora pulsu GnRH, czy indukowało przedowulacyjną falę LH. Jak donoszą Downing i wsp. [36] infuzja glukozy do obwodowego krążenia podczas późnej fazy lutealnej u owiec nie wpływa na wzrost częstotliwości pulsów LH, a długotrwałe podawanie glukozy, zwłaszcza zwierzętom przeżuującym, może wręcz negatywnie wpływać na wykorzystanie paszy, strawność białka i bilans energetyczno-białkowy. Wykazano ponadto, że hiperglikemia tłumia na poziomie przysadki odpowiedź LH na GnRH [7]. W związku z tym równowaga metabolizmu glukozy i indywidualny stan energetyczny są prawdopodobnie najistotniejszymi czynnikami regulującymi wpływ tego substratu na reprodukcyjną oś podwzgórzowo-przysadkową [138]. Rozpatrując omawiane zagadnienie w tym aspekcie uważa się, iż ważnym elementem w przekazywaniu informacji o stanie energetycznym organizmu do centralnych ośrodków kierujących

procesami rozrodczymi jest insulina i leptyna, dla których receptory wykryto między innymi w wyniosłości pośredkowej podwzgórza [22, 106].

Prawidłową czynność hormonalną osi podwzgórzowo-przysadkowo-jajnikowej warunkuje również prolaktyna (PRL) syntetyzowana i uwalniana przez komórki laktotropowe przedniego płata przysadki. Regulacja wydzielania prolaktyny jest procesem złożonym, w który zaangażowanych jest wiele podwzgórzowych czynników. Wiadomo, że na jej wydzielanie wpływa katecholamina, a głównym inhibitorem jest dopamina [110]. Oddziaływanie dopaminy może odbywać się za pośrednictwem co najmniej dwóch klas receptorów dopaminergicznych  $D_1$  i  $D_2$ . Aktywacja receptorów  $D_2$  prowadzi do spadku wewnątrzkomórkowego stężenia cAMP, który redukuje zarówno uwolnienie PRL jak i transkrypcję genu. Na regulację syntezy prolaktyny duży wpływ mają także estrogeny. Podanie tych sterydów powoduje spadek podwzgórzowej dopaminy, a tym samym wzrost sekrecji prolaktyny. Do hormonów wpływających na wydzielanie PRL należy również podwzgórzowa tyreoliberyna (TRH), która oprócz uwalniania tyreotropiny (TSH) wykazuje zdolność bezpośredniego uwalniania prolaktyny. U szczurów z wyciętymi tarczycami obserwuje się hierprolaktynemię i możliwe, że powoduje ją wzrost uwalniania TRH [152]. Badania ostatnich lat wykazały, że dobowy rytm uwalniania prolaktyny może być przynajmniej częściowo zależny od rytmu dobowej sekrecji melatoniny [109, 110]. Stwierdzono, że istnieje zależność pomiędzy szyszynką a osią podwzgórzowo-przysadkowo-gonadową. Jednakże większość prac u kóz czy owiec dotyczy udziału melatoniny w kontroli sezonowych zmian w reprodukcji. Niewiele jest natomiast danych i nie ma jednoznacznych opinii o ewentualnym udziale tego hormonu w regulacji cyklu płciowego.

## 1.2. REGULACJA NA POZIOMIE JAJNIKA

Podstawą podziału cyklu rujowego na fazę pęcherzykową (folikularną) i fazę ciała żółtego (lutealną) są czynnościowe i morfologiczne zmiany zachodzące w jajniku. W fazie pęcherzykowej zadaniem regulacyjnym jest wzrost oraz różnicowanie się komórek budujących pęcherzyki i stworzenie właściwego mikrośrodowiska dla dojrzewających oocytów. Pod koniec tej fazy dochodzi do owulacji, a w miejscu pękniętego pęcherzyka tworzy się ciało żółte inicjujące fazę lutealną. Procesy jakie

zachodzą w tej fazie związane są z przebudową pękniętego pęcherzyka i wzmożoną produkcją progesteronu, a następnie unieczynnieniem ciałek żółtych co jest warunkiem inicjacji nowego cyklu. Zatem istotnymi zadaniami stojącymi przed układami regulacyjnymi w każdej z tych faz jest nie tylko rozwój pęcherzyka czy wytworzenie ciała żółtego, ale również atrezja pęcherzykowa i regresja lutealna. Chociaż w każdej z tych faz realizowane są inne zadania regulacyjne i przebiegają inne procesy, to zasadniczym celem tych zmian jest stworzenie wewnątrzjajnikowego środowiska umożliwiającego uwolnienie zdolnej do zapłodnienia komórki jajowej [13, 14].

Cykl rujowy u kóz trwa przeciętnie 21 dni (19-23 dni), przy czym występują różnicowania rasowe dotyczące długości okresu końcowego wzrostu pęcherzyków jajnikowych. U ras klimatu tropikalnego, przedowulacyjne dojrzewanie pęcherzyków trwa od 4 do 5 dni, podczas gdy u ras klimatu umiarkowanego od 2 do 3 dni. Długość fazy lutealnej u tego gatunku jest względnie stała i wynosi od 16 do 17 dni [92].

U kóz stwierdzono falowy charakter dojrzewania pęcherzyków w określonych grupach i czasie. Zaobserwowano co najmniej cztery fale pęcherzyków, które jak podają Schwarz i Wierzchoś [139] wzrastają w odstępach 4 dniowych. Zdaniem powyższych autorów liczba fal pęcherzyków w cyklu rujowym kóz nie jest cechą osobniczą, ale wartością zmienną. Dotychczas nie udało się określić jakie czynniki wpływają na ilość fal u kóz, ale nie wykluczone, iż podobnie jak u bydła zależy ona od długości fazy ciała żółtego [43]. Z badań poczynionych przez Gonzaleza-Valle i wsp. [52] wynika, że tylko jedna fala związana jest z owulacją.

Te pęcherzyki, których dojrzałość pozwoli na „skorzystanie” w odpowiednim czasie z podwyższonego poziomu folitropiny mają szansę na dalszy rozwój. Wyniki badań cytowane przez Schwarza i Ziębę [140] wskazują, że w cyklu rujowym kóz, taką zdolność posiadają tylko pęcherzyki o średnicy większej niż 4 mm. Związane jest to niewątpliwie z dostatecznym wykształceniem komórek składowych pęcherzyka w kolejnych stadiach proliferacji i różnicowania, odpowiednim składem płynu pęcherzykowego, a także z wrażliwością na działanie FSH, którą osiągają przy odpowiedniej ilości receptorów dla tej gonadotropiny. Dzięki temu pęcherzyki mogą wykorzystać FSH, co decyduje o ich dalszym losie. Nie wszystkie jednak pęcherzyki osiągają próg wrażliwości na gonadotropiny. U dojrzałych płciowo samic w każdym cyklu rujowym rozpoczyna wzrost od 500 do 1000 pęcherzyków pierwotnych, ale tylko niewielka charakterystyczna dla danego gatunku ilość kończy rozwój na etapie pęcherzyka Graafa i osiąga zdolność do owulacji [66]. Pozostałe, w różnych stadiach

rozwojowych ulegają masowej atrezji, która jest najbardziej wspólną cechą wszystkich pęcherzyków [13].

Procesy związane z końcowym dojrzewaniem pęcherzyków są całkowicie zależne od obu gonadotropin, które po interakcji ze swoimi receptorami i aktywacji procesów zależnych od cAMP wzmagają aktywność enzymów steroidogennych w komórkach warstwy ziarnistej i osłonki wewnętrznej. W początkowym stadium tej fazy związanym z selekcją i dominacją decydującą rolę odgrywa folitropina. W obrębie jajnika, FSH łączy się prawie wyłącznie z receptorami znajdującymi się w błonach komórek ziarnistych. Przekazywanie sygnału do wnętrza komórki odbywa się za pośrednictwem białka  $G_s$ , które aktywuje cyklazę adenylową potrzebną do produkcji cAMP. Wzrost tego związku uaktywnia kinazę białkową A, która z kolei fosforyluje czynniki transkrypcyjne, wpływając na ekspresję odpowiednich genów [144]. W wyniku działania folitropiny dochodzi do syntezy jej własnych receptorów, indukcji podziałów mitotycznych komórek warstwy ziarnistej, formowania receptorów dla LH (rLH), głównie w obwodowych warstwach granulozy w tzw. warstwie muralnej. Ponadto w komórkach ziarnistych pod wpływem FSH powstają receptory dla prolaktyny [2]. Jednakże najważniejsza funkcja FSH polega na aktywacji systemu aromatyzacji, dzięki której dochodzi do wzmożonej produkcji  $17\beta$ -estradiolu ( $E_2$ ).

Stężenie estradiolu we krwi jest najwyższe w okresie przedrujowym i rujowym. Hormon ten pochodzi głównie z pęcherzyka dominującego i jest niezmiernie ważny dla jego dalszego rozwoju, a w świetle nowszych badań również dla osiągnięcia dojrzałości cytoplazmatycznej oocytu [40]. Estradiol zwiększa aktywność mitotyczną w komórkach warstwy ziarnistej, stymuluje powstawanie złącz szczelinowych i tworzenie się jamki, pobudza syntezę receptorów gonadotropowych, a także wpływa na syntezę własnych receptorów. Dzięki temu na drodze autokrynej i parakrynej reguluje funkcję pęcherzyka czyniąc go wrażliwym na sygnały prowadzące do owulacji. Spośród tych sygnałów za najważniejszy uważa się przedowulacyjny wyrzut LH, uruchamiający kaskadę reakcji prowadzących do uwolnienia komórki jajowej. Ponadto lutropina jest głównym hormonem odpowiedzialnym za zmianę kierunku steroidogenezy i luteinizację [66, 148].

Dominująca rola FSH i LH w dojrzewaniu pęcherzyków jest dobrze udokumentowana, jednakże w ostatnich latach lista czynników modulujących folikulogenezę czy wpływających na indukowaną przez gonadotropiny steroidogenezę znacznie wzrosła. Należą do nich zarówno inne hormony przysadkowe takie jak

prolaktyna i hormon wzrostu, hormony pozagonadowe, a także liczne steroidowe i niesteroidowe związki obecne lub syntetyzowane w jajniku.

Szczególnie interesujące są badania dotyczące czynników regulujących wzrost pęcherzyków przedantralnych, który jest względnie niezależny od gonadotropin. W zakresie tych badań na uwagę zasługują doniesienia Mayerhofera i wsp. [104] wskazujące na rolę w tym procesie neurotransmiterów uwalnianych z nerwów jajnikowych, które poprzez system produkujący cAMP wpływają na proces różnicowania pęcherzyków pierwotnych i powodują ekspresję genu receptora FSH.

Wielu autorów podaje, że czynnikiem niezbędnym w rozwoju małych pęcherzyków jest hormon wzrostu (GH), którego działanie na większość tkanek odbywa się przez stymulację insulinopodobnego czynnika wzrostu (IGF-I) [54, 85]. Nie jest znana dokładna relacja pomiędzy GH a folikulogezą u kóz ale warto odnotowania są wyniki uzyskane przez Barana [6], który wykazał wzrost stężenia tego hormonu we krwi podczas stymulowanej rui u kóz rasy polskiej białej uszlachetnionej. Wyniki te wskazują, że hormon wzrostu może uczestniczyć również w końcowym dojrzewaniu pęcherzyków. Jednak Driancourt i Disenhaus [39] podając przez dłuższy okres egzogenny GH kozom w okresie laktacji nie wykazali żadnego wpływu tego hormonu na wzrost i liczbę pęcherzyków. Autorzy nie wykluczają jednakże udziału GH w kontroli wzrostu pęcherzyków sugerując, że stan fizjologiczny zwierząt jakim jest laktacja może wpływać na brak odpowiedzi jajników.

Kolejnym przysadkowym hormonem uczestniczącym w regulacji pęcherzykowego rozwoju jest prolaktyna. Stężenie tego hormonu we krwi nie wykazuje tak charakterystycznych zmian jak stężenia gonadotropin, ale na podstawie aktualnej wiedzy uważa się, że wpływa on na funkcję komórek pęcherzykowych. W doświadczeniach *in vitro* wykazano, że prolaktyna hamuje produkcję progesteronu w komórkach granulozy pobranych z małych, niedojrzałych pęcherzyków jajnikowych świń [164]. Prace Gregoraszcuk [53] wskazują ponadto na udział tego hormonu w luteinizacji komórek pęcherzykowych i stymulacji syntezy progesteronu bezpośrednio po owulacji. Nie wykluczone, że indukujący wpływ prolaktyny na steroidogenezę w tym okresie polega na wzmagananiu wykorzystania cholesterolu [131]. Opublikowane ostatnio badania Bowena i wsp. [19] na szczurach wykazały stymulujący wpływ prolaktyny na wzrost ekspresji białka powierzchniowego MCP klasy I będącego potencjalnym mediatorem rekrutacji monocytów/makrofagów. Espey [41] i Machelon

[95] podkreślają zaś udział komórek układu odpornościowego w przemodelowaniu struktury i funkcji pęcherzyków.

W kontroli wzrostu i różnicowania komórek pęcherzykowych biorą udział również obecne w jajniku liczne czynniki wzrostowe. Obok wspomnianego IGF-I do czynników zwiększających odpowiedź komórek ziarnistych na działanie FSH należy epidermalny czynnik wzrostu (EGF) czy transformujący czynnik wzrostu  $\beta$  TGF $\beta$ . Najnowsze badania wykazały, że wzmagają one mitozę komórek ziarnistych i aktywność komórkową poprzez regulację enzymów metabolizmu glukozy [137]. Należy podkreślić, iż w okresie wzmożonego wzrostu i proliferacji komórek składowych pęcherzyka zapotrzebowanie na energię jest nasilone i poznanie czynników wpływających na system enzymatyczny glikolizy w tej strukturze jajnika ma istotne znaczenie.

Rozpatrując omawiane zagadnienia wartym odnotowania są wyniki badań dotyczące metabolizmu jajnika. Rabiee i wsp. [129, 130] stwierdzili, że głównym i prawdopodobnie jedynym źródłem energii dla jajnika u owiec i krów jest glukoza. Grupa wymienionych autorów analizując poziom transportowanych i zużywanych w jajniku metabolitów zanotowała też wzmożoną produkcję mleczanu co wskazuje na beztlenowy szlak glikolizy [129]. Nie wyjaśniono dotychczas znaczenia powyższych procesów, niemniej jednak muszą one posiadać fizjologiczne uzasadnienie.

Fakt, że glukoza jest głównym źródłem energii dla jajnika prawdopodobnie jest ważnym czynnikiem adaptacyjnym samic do niekorzystnych warunków środowiskowych związanych z ograniczoną dostępnością pożywienia. W przypadku niedoboru glukozy, w organizmie uruchomione zostają mechanizmy związane z lipolizą, jednakże niska zdolność wykorzystania kwasów tłuszczowych przez jajnik jako źródła energii doprowadza do zahamowania cyklu rujowego, a tym samym zapobiega wydaniu na świat potomstwa w niesprzyjających warunkach.

Znaczenie zaś beztlenowego metabolizmu glukozy przypuszczalnie polega na oszczędzaniu tlenu, który w jajniku „zarezerwowany” jest głównie do syntezy hormonów steroidowych. Do wyprodukowania jednej cząsteczki progesteronu wymagane są bowiem trzy cząsteczki tlenu [130].

Udział glukozy w regulacji lokalnej nasila się zwłaszcza w okresie okołowulacyjnym, a jej zwiększone zużycie zanotowano podczas indukowanego przez gonadotropiny dojrzewania mejotycznego oocytów [38]. W zakresie regulacji wykorzystania glukozy na poziomie pęcherzykowym ważną rolę pełni insulina, dla



której receptory wykazano w komórkach granulozy i oocytach [106]. Na rolę insuliny wskazuje również fakt, iż jest ona jednym ze składników płynu pęcherzykowego [66, 124].

W badaniach wykonanych przez Dowinga i wsp. [36] na owcach stwierdzono, że podwyższone stężenie insuliny, następujące po infuzji glukozy do krwiobiegu, wzmagają aktywność mitogenną komórek granulozy, chroni pęcherzyki przed atrezią i zwiększa pulę pęcherzyków owulujących. Ponadto w powyższym doświadczeniu zanotowano bardzo podobny profil uwalniania FSH i insuliny, co wskazuje na synergizm tych hormonów w omawianym procesie i potwierdza hipotezę o „gonadotropowej” funkcji insuliny. Podkreślić jednak należy, iż sama insulina podana pod koniec fazy lutealnej nie wykazuje takiego działania, a nawet wpływa szkodliwie na tkanki wywołując hipoglikemię. Cytowani wyżej badacze sugerują, że stymulujące działanie insuliny na wzrost pęcherzyków możliwe jest tylko z jednoczesnym wzrostem dostępności glukozy. Równie interesujące są wyniki badań uzyskane przez Bolanda i wsp. [16]. Autorzy w hodowlach komórek pęcherzykowych myszy zanotowali wzmożone wykorzystanie glukozy pod wpływem gonadotropin.

Z dostępnych danych wynika, że insulina i (lub) glukoza może modulować pęcherzykowy rozwój również poprzez wpływ na aktywność enzymów steroidogennych [138], mitozę komórek osłonkowych [145] i mejotyczne dojrzewanie oocytów [37]. W wielu opracowaniach wskazuje się na stymulujący wpływ insuliny na syntezę progesteronu przez komórki granulozy oraz na udział insuliny i kortyzolu w procesie luteinizacji [50, 106]. Ponadto wykazano, że glukokortykoidy wywierają supresyjny wpływ na aktywność aromatazy poprzez selektywne hamowanie receptorów dla LH w komórkach granulozy [50].

W procesach związanych z aktywnością wydzielniczą pęcherzyków rozważa się także znaczenie melatoniny. Opublikowane ostatnio wyniki badań *in vitro* wykazały bezpośredni hamujący efekt tego hormonu na steroidogenezę pęcherzyków jajnikowych nornicy [47]. Również w doświadczeniach *in vivo* po iniekcji melatoniny zanotowano spadek poziomu estradiolu we krwi i wzrost pęcherzykowej atrezji [28]. Równie interesujące wyniki przedstawili Turi i Garzetti [157], którzy wykazali różnice pomiędzy profilem melatoniny we krwi u kobiet normalnie jajczkujących a profilem melatoniny u kobiet bezpłodnych. Cytowani autorzy wykazali ponadto obecność tego hormonu w płynie pęcherzykowym.

Oprócz wymienionych czynników zainteresowanie wzbudzają badania dotyczące działania hormonów tarczycy w obrębie komórek pęcherzykowych. Znaczenie tych hormonów w prawidłowej czynności jajnika było niejednokrotnie poruszane z uwagi na fakt, że zaburzenia tarczycy negatywnie wpływają na reprodukcję. Niewątpliwie zakłócona cykliczność rujowa spowodowana hiper- czy hipotyreozą pośrednio związana jest z ogólnoustrojowymi zaburzeniami metabolicznymi. Jednakże w ostatnich latach wykazano bezpośredni wpływ hormonów tarczycy na jajnik wskazując, że fizjologiczne stężenie tych hormonów są kolejnym czynnikiem warunkującym rytmiczność procesów zachodzących w cyklu rujowym [50].

Większość badań w zakresie tego zagadnienia obejmuje ludzi, świnię i gryzonia. U tych ssaków, w obrębie pęcherzyków wykryto istnienie receptorów dla hormonów tarczycy w chromatynie jąder komórek warstwy ziarnistej, komórkach wzgórkajajonośnego i oocytach [27, 56, 166, 167, 174]. Ponadto w płynie pęcherzykowym stwierdzono obecność tyroksyny ( $T_4$ ) i trójdotyroniny ( $T_3$ ) na poziomie zbliżonym do stężenia tych hormonów w osoczu krwi [174]. Wakim i wsp. [167] sugerują, że hormony tarczycy są „uprzywilejowane” gdyż przenikają barierę krew-pęcherzyk bez udziału transportu aktywnego, ale na drodze prostej dyfuzji. W zależności od stadium rozwojowego pęcherzyka hormony tarczycy są selektywnie wychwytywane i w wyniku interakcji z receptorami przyczyniają się do efektów metabolicznych. To selektywne wychwytywanie, jak również zróżnicowany wpływ hormonów tarczycy w dużej mierze zależy od rodzaju receptorów. Nie wyklucza się bowiem istnienia, poza receptorami jądrowymi, obecności receptorów cytozolowych będących głównym miejscem konwersji  $T_4$  do  $T_3$  i mitochondrialnych poprzez które hormony tarczycy bezpośrednio aktywują oksydazy cytochromowe z grupy P450 [34, 55, 174].

Powyższe zależności w pewnym stopniu tłumaczą niejednoznaczne doniesienia na temat funkcji hormonów tarczycy w kontroli wzrostu i rozwoju pęcherzyka. Wśród tematyki badawczej obejmujących to zagadnienie wartym odnotowania są wyniki uzyskane przez Hayashi i wsp. [60, 61] oraz Maruo i wsp. [102]. Wymienieni autorzy w hodowlach świńskich komórek granulocy pobranych z małych pęcherzyków stwierdzili synergistyczne działanie tyroksyny ( $T_4$ ) i trójdotyroniny ( $T_3$ ) z FSH w stymulowaniu mitozy i różnicowaniu komórek ziarnistych, w indukcji syntezy receptorów dla LH i aktywacji enzymów steroidogennych ( $3\beta$ HSD i aromatazy). W kolejnych badaniach grupa cytowanych badaczy wykazała, że ilość receptorów dla  $T_3$  w jądrach komórek granulocy maleje wraz ze wzrostem pęcherzyka [101].

Odmienne wyniki uzyskali Gregoraszczyk i wsp. [56], którzy w hodowlach komórek osłonkowych i granulocy wykazali hamujący wpływ  $T_3$  na podstawową i indukowaną przez FSH aktywność aromatyzacyjną i produkcję estradiolu przy równoczesnym wzroście sekrecji androgenów. Należy jednak podkreślić, że komórki te pozyskiwano z dużych pęcherzyków przedowulacyjnych. Dlatego też uważa się, że interakcja hormonów tarczycy z gonadotropinami reguluje pęcherzykową steroidogenezę w zależności od wielkości i stadium rozwojowego pęcherzyka; we wczesnym okresie antralnym wzmagając działanie FSH, a w okresie przedowulacyjnym hamując syntezę estradiolu i wpływając na luteinizację [57]. Najnowsze badania sugerują udział hormonów tarczycy w owulacji i w uzyskaniu zdolności zapładniającej komórek jajowych [27, 51]. Wykazano, że tyroksyna może uczestniczyć w regulacji syntezy inhibiny, hormonu uważanego za jeden z najważniejszych lokalnych regulatorów jajnikowych [152].

Komórki granulocy zaczynają wydzielać inhibinę jeszcze przed rozpoczęciem syntezy estradiolu na etapie przedantralnym i wydzielanie to trwa przez cały okres dojrzewania pęcherzykowego. Inhibina poprzez działanie parakryne reguluje wzrost pęcherzyków i odgrywa ważną rolę w dojrzewaniu jądrowym oocytu [40]. Wpływa na steroidogenezę stymulując sekrecję progesteronu przy równoczesnym hamowaniu produkcji estradiolu, a także działając jako hormon obwodowy hamuje wraz z estradiolem syntezę FSH. Supresyjnie na syntezę FSH wpływa również inny hormon polipeptydowy jajnika – folistatyna. Antagonistycznie w stosunku do inhibiny działa aktywina, która stymuluje sekrecję FSH z przysadki, obniża syntezę progesteronu, a poprzez indukcję receptorów LH w komórkach ziarnistych wzmacnia produkcję estradiolu [142, 148]. Poza wymienionymi już inhibiną, aktywiną i folistatyną do białek produkowanych przez pęcherzyk należy czynnik hamujący „pik” gonadotropin (GnSIF) [142]. Peptydy te tworzą wewnątrzjajnikowe pętle regulacyjne.

Przedstawione dane potwierdzają dominującą rolę gonadotropin i steroidowych hormonów jajnikowych w kontroli wzrostu i dojrzewania pęcherzykowego, ale wskazują też jak wiele innych czynników pochodzenia jajnikowego czy pozajajnikowego może uczestniczyć w tym złożonym procesie. W wielu przypadkach ich dokładne działanie nie zostało w pełni wyjaśnione, a opublikowane prace dotyczą nielicznych gatunków zwierząt. Można jednak sądzić, że stanowią one ważne ogniwa w kolejnych stadiach proliferacji i różnicowania pęcherzyka jajnikowego u większości ssaków, w tym również u kóz.

### 1.3. STEROIDOGENEZA PĘCHERZYKOWA

Steroidogeneza jest ciągiem wzajemnie powiązanych reakcji, które podlegają wieloczynnikowej regulacji dotyczącej zarówno aktywności poszczególnych enzymów, jak i też substratów i produktów. Wyprodukowane steroidy w bardzo istotny sposób regulują dalszą steroidogenezę, służąc jako substrat lub modulując aktywność enzymów.

Pęcherzyki jajnikowe syntetyzują steroidy należące do progestagenów, androgenów i estrogenów, a ich wspólnym prekursorem jest cholesterol. Wyjątkowość komórek steroidogennych polega na tym, że wykorzystują cholesterol nie tylko do budowy struktur błonowych, ale również do produkcji hormonów steroidowych [129]. W komórkach steroidogennych jajnika cholesterol może być syntetyzowany *de novo* z octanu, w wieloetapowej reakcji, w której enzymem regulującym jest reduktaza 3-hydroksy-3-metylo-koenzym-A (enzym wrażliwy na gonadotropiny) [142]. Z badań wykonanych na owcach wynika, że LH pobudza metabolizm octanu w czasie indukowanej superowulacji [129]. Cholesterol może być też pozyskiwany z estrów cholesterolu nagromadzonych w kroplach lipidowych [5]. Jednakże głównym źródłem cholesterolu dla komórek pęcherzyka jajnikowego są lipoproteiny niskiej (LDL – light density lipoproteins) i wysokiej gęstości (HDL – high density lipoproteins), dostarczane z krwią [4, 66]. W procesie biosyntezy jajnikowych i nadnerczowych hormonów sterydowych bierze udział około 25% krążącego cholesterolu [97]. Istnieją dane wskazujące, iż poziom krążących lipoprotein odgrywa ważną rolę w regulacji własnych receptorów w komórkach steroidogennych jajnika [131].

Udział poszczególnych frakcji lipoprotein w steroidogenezie jajnikowej u różnych gatunków zwierząt nie został dostatecznie zbadany. Sugeruje się, że do czasu przedowulacyjnego wyrzutu LH dominuje wykorzystanie cholesterolu transportowanego przez LDL, natomiast zdolność wykorzystania cholesterolu transportowanego przez HDL pojawia się w okresie luteinizacji [85]. Ponadto różne subpopulacje komórek składowych pęcherzyka wykazują zróżnicowaną zdolność wykorzystania cholesterolu. Dostępność tego substratu dla poszczególnych komórek zależy od typu komórki, jej lokalizacji, stopnia zróżnicowania i obecności receptorów dla lipoprotein. Cząsteczki lipoprotein po związaniu się ze swoimi receptorami dostają się do cytoplazmy komórki na drodze endocytozy. Wewnątrz komórki pęcherzyki

pinocytarne ulegają fuzji z lizosomami, a estry cholesterolu hydrolyzowane są do wolnego cholesterolu. Po procesie reestryfikacji i ponownej hydrolyzie wolny cholesterol wiąże się z białkiem nośnikowym i dociera do mitochondriów. W tej strukturze komórkowej zachodzą reakcje związane z przejściem cholesterolu w pregnenolon. Etap ten wymaga obecności cytochromu P450<sub>SCC</sub>, enzymu odszczepiającego boczny łańcuch cholesterolu, który zlokalizowany jest w wewnętrznych błonach mitochondrialnych. Z kolei następne etapy steroidogenezy przebiegają w retikulum endoplazmatycznym, gdzie znajdują się pozostałe enzymy zaangażowane w ten proces. Przy udziale dehydrogenazy 3- $\beta$ -hydroksysteroidowej (3 $\beta$ -HSD) i izomerazy  $\Delta^{4-5}$  zachodzi konwersja pregnenolonu do progesteronu. Kolejny etap obejmuje hydroksylację progesteronu, w wyniku której powstają androgeny. Reakcje te wymagają obecności cytochromu specyficznego dla 17 $\alpha$ -hydroksylazy/c17-20-liazy (P450<sub>c17 $\alpha$</sub> ). W dalszym etapie część androgenów aromatyzowana jest do estrogenów; testosteron do estradiolu, a androstendion do estronu. Proces aromatyzacji regulowany jest przez enzym P450<sub>arom</sub> [142].

Przez wiele lat zdania na temat syntezy estrogenów w pęcherzyku jajnikowym były podzielone. Próba wyjaśnienia mechanizmu syntezy tego sterydu, godzącą różne, niekiedy sprzeczne fakty, jest tzw. teoria dwóch komórek. Zakłada ona, że prekursorzy androgenne, syntetyzowane w komórkach tekalnych pod wpływem LH, dyfundują przez błonę podstawną do komórek ziarnistych gdzie ulegają kontrolowanej przez FSH aromatyzacji. Proces ten katalizuje aromataza zawarta w komórkach ziarnistych [66]. Jak donosi Hillier [63] tempo syntezy androgenów dostrojone jest z tempem ich aromatyzacji prawdopodobnie dzięki lokalnemu sprzężeniu zwrotnemu. Zapewnia to najintensywniejszą syntezę omawianych hormonów.

Wielkość sekrecji steroidów jajnikowych ulega znacznym wahaniom zależnym od stadium rozwojowego pęcherzyka. Do czasu przedowulacyjnego wyrzutu LH w pęcherzykach jajnikowych dominuje produkcja androgenów i estrogenów, natomiast po tym okresie przeważa produkcja progestagenów.

Miejscem syntezy androgenów są komórki osłonki wewnętrznej, a główną gonadotropiną stymulującą ich produkcję jest LH [142]. Androgeny odgrywają szczególną rolę w dojrzewaniu pęcherzyka, zwłaszcza w czasie tworzenia się antrum [143]. W okresie przedowulacyjnym hormony te wzmagają aktywność stymulowanej przez FSH aromatazy natomiast po „piku” LH ich działanie jest znikome [85].

Synteza estrogenów zachodzi w wyniku przedstawionej wcześniej interakcji komórek tekalnych i ziarnistych. Proces aromatyzacji w komórkach granulocyty stymulowany jest początkowo przez FSH, a w miarę dojrzewania pęcherzyka, po pojawieniu się receptorów dla LH również przez tę drugą gonadotropinę. Umożliwia to intensywniejszą aromatyzację, a tym samym większą produkcję estrogenów, których stężenie zarówno w płynie pęcherzykowym jak i we krwi w okresie poprzedzającym „pik” LH znacznie wzrasta. Należy jednak podkreślić, że nie wszystkie komórki ziarniste posiadają jednakową zdolność aromatyzacyjną. Największą aktywność w tym procesie wykazują komórki muralne [148]. To właśnie one są głównym źródłem estrogenów, z których najaktywniejszym biologicznie jest 17- $\beta$ -estradiol.

Pod jego wpływem zachodzi proliferacja i różnicowanie nabłonka pochwowego, błony śluzowej macicy (*endometrium*) i nabłonka jajowodów, a poprzez indukcję syntezy prostaglandyn estradiol wpływa na wzrost kurczliwości i perystaltyki jajowodów. Hormon ten działa pobudzająco na wydzielanie przez nabłonek szyjki macicy bogatego w mukopolisacharydy i sole przezroczystego śluzu, na rozluźnienie błony mięśniowej okrężnej szyjki umożliwiając tym samym penetrację plemników. Estradiol powoduje również rozwój gruczołu mlekowego pobudzając wzrost nabłonka kanalików oraz pęcherzyków gruczołowych, a także rozwój podścieliska łącznotkankowego i tkanki tłuszczowej. Jednakże działanie estradiolu nie ogranicza się tylko do tkanek narządu rodowego. Podwyższony poziom tego hormonu we krwi jest bowiem sygnałem dla całego organizmu o stanie przygotowania do owulacji i zapłodnienia. Działając na mózg wpływa na zachowanie się zwierząt indukując behavior seksualny i ogólną ruchliwość samic. Konsekwencją powyższych zmian jest ruja, która u kóz trwa przeciętnie 36 godzin z wahaniami od 22 do 60 godzin [70]. Zwierzęta w tym czasie stają się niespokojne, często oddają mocz, pobekują, nienaturalnie merdają ogonem, obwąchują inne kozy i wykazują chęć ich obskakiwania. Za typową oznakę rui uważa się tzw. odruch tolerancji. Z dróg rodnych wydziela się w tym czasie dużo śluzu o specyficznym, atrakcyjnym dla samca zapachu. Obrzmienie i przekrwienie zewnętrznych narządów płciowych działa pobudzająco na samca i ułatwia kopulację.

Estradiol wykazuje ponadto wielokierunkowe oddziaływanie biologiczne aktywując między innymi procesy kataboliczne w wątrobie i tkance tłuszczowej związane z metabolizmem węglowodanów i lipidów [58]. Udział estradiolu w regulacji przemian węglowodanowych zachodzi pod wpływem insulinopodobnego czynnika wzrostu, hormonu wzrostu i hormonów tarczycy. Istnieją dane wskazujące, że estradiol

zwiększa stężenie białka wiążącego hormony tarczycy (*thyroxin binding globulin* – TGB), wskutek czego zostaje zmieniona ich biologiczna dostępność i przemiana. W zakresie metabolizmu lipidów estradiol wpływa na pobudzenie syntezy lipoprotein transportujących cholesterol HDL i obniżenie poziomu cholesterolu frakcji LDL. Wykładnikiem przemian lipidowych związanych z sekrecją estradiolu mogą być zmiany stężeń lipoprotein w osoczu krwi, które zanotowano w przebiegu cyklu płciowego u owiec [171] i kobiet [94]. Regulacja metabolizmu lipidów nie jest zależna wyłącznie od estradiolu, ale również od pozostałych hormonów, żywienia, aktywności ruchowej i wielu innych czynników. Uważa się jednak, iż wszelkie zaburzenia czynności jajników wywierają negatywny wpływ na ich metabolizm.

W przeciwieństwie do estradiolu, wpływ progesteronu na przemiany metaboliczne lipidów nie jest równie jednoznaczny. Wykazano bowiem, że różnice stężeń LDL i HDL we krwi pomiędzy fazą pęcherzykową a fazą lutealną są zależne głównie od poziomu estradiolu, a nie od fluktuacji w poziomie progesteronu [89].

W okresie przedowulacyjnym, po wyrzucie LH, następuje gwałtowny spadek produkcji estrogenów. Z badań przeprowadzonych przez Kajtę na szczurach [74] można sądzić, że supresja syntezy estrogenów spowodowana jest w pierwszym rzędzie brakiem androgenów i spadkiem aktywności aromatazy. Ponadto dopiero w tym okresie komórki ziarniste wykazują ultrastrukturę komórek steroidogennych, co znajduje swój wyraz w pojawieniu się w nich silnej aktywności P450<sub>c17α</sub> [148] i zdolności wykorzystania lipoprotein [142]. Istnieją dane wskazujące, iż po przysadkowym wyrzucie LH również komórki ziarniste wzgórka jajonośnego, których dotychczasowa rola polegała głównie na produkcji substancji odżywczych dla oocyty, zaczynają przejawiać aktywność steroidogenną. Dzięki tym zmianom pęcherzykowa steroidogeneza przestawiona zostaje na produkcję progesteronu, który uczestniczy w procesach prowadzących do aktywacji enzymów proteolitycznych rozkładających ścianę pęcherzyka [148] i aktywuje białka odpowiedzialne za dojrzewanie mejotyczne oocyty [14]. Wyniki badań Bar-Ami cytowane przez Szołtys [149] wskazują na korelację potencjału zapłodnialności oocytów ze zdolnością komórek wzgórka do syntezy progesteronu. Twierdzi się także, że progesteron może regulować tempo przejścia oocyty przez jajowód, a obecność receptorów dla progesteronu w plemnikach może świadczyć o jego ważnej roli w indukcji reakcji akrosomalnej [149]. Istnieją również dane wskazujące na immunosupresyjne działanie progesteronu, przejawiające się hamującym wpływem na aktywację leukocytów [141]. Wydaje się, iż ta funkcja

progesteronu związana jest z wytworzeniem stanu tolerancji wobec obcego (ojcowskiego) zestawu antygenów. Progesteron jest zatem koniecznym składnikiem środowiska komórki jajowej po jej uwolnieniu z pęcherzyka i odgrywa istotną rolę w prawidłowym przebiegu zapłodnienia, w czasie pierwszych podziałów zygoty oraz implantacji blastocysty w macicy.

Po owulacji ze ścian pękniętego pęcherzyka powstaje ciało żółte (*corpus luteum*), które przejmuje steroidogenną aktywność komórek pęcherzykowych. Komórki ziarniste ulegają przekształceniu w duże komórki luteinowe, a komórki osłonki wewnętrznej w komórki małe [14]. Metabolizm tych komórek nastawiony jest głównie na produkcję progesteronu, który uwolniony do krwi hamuje na zasadzie ujemnego sprzężenia zwrotnego wydzielanie LH. Ten blokujący efekt powoduje, że okresowe fale pęcherzyków jajnikowych i przemijające wydzielanie estradiolu w fazie lutealnej nie prowadzą do owulacji. Progesteron wpływa również na zmianę behawioru tłumiąc aktywność seksualną. U wielu zwierząt obserwuje się behawior związany z gromadzeniem zapasów. Ogólnoustrojowe działanie progesteronu związane jest również z oszczędzaniem substratów energetycznych, a procesy anaboliczne mają przewagę nad katabolicznymi wykazując z reguły działanie antyestrogenne [141].

Powyższe dane wskazują, iż jajnikowe hormony sterydowe odpowiedzialne są nie tylko za cykliczne zmiany w tkankach narządu rozrodczego, ale również poprzez wielostronne oddziaływanie metaboliczne wpływają na zmiany ogólnoustrojowe w przebiegu cyklu rujowego. Można zatem sądzić, iż odpowiednio długi czas trwania aktywności ciała żółtego jest fazą cofania się zmian przystosowawczych do ciąży, regeneracji i przygotowania organizmu do intensywnych i dynamicznych przemian zachodzących w fazie pęcherzykowej, konsekwencją których jest owulacja.

## 2. MORFOLOGICZNE I FUNKCJONALNE ZMIANY TOWARZYSZĄCE OWULACJI

Najistotniejszym momentem cyklu rujowego jest owulacja, polegająca na pęknięciu dojrzałego pęcherzyka jajnikowego i uwolnieniu komórki jajowej na skutek współdziałania złożonych mechanizmów kontrolowanych przez układ endokryny, nerwowy i immunologiczny. Uważa się, że w procesie tym szczególne znaczenie ma lutropina, której gwałtowne stężenie we krwi zapoczątkowuje zmiany owulacyjne. Jakkolwiek w biologii trudno mówić z dużą dokładnością o niezmienności zjawisk, to



wyniki badań pozwalają sądzić, iż czas pomiędzy „pikiem” LH a pęknięciem pęcherzyka dla danego gatunku zwierząt jest wartością względnie stałą. Jak podają Mori i wsp. [114] u kóz wynosi on około 21 godzin. Oczywiście istnieją nieznaczne wahania wynikające z różnic rasowych i osobniczych, ale wartym odnotowania jest fakt, iż większe odchylenia dotyczą czasu od luteolizy do „piku” LH niż od „piku” LH do owulacji [134].

Gwałtowny wzrost stężenia lutropiny powoduje zmiany biochemiczne w oocycie, których wynikiem jest wznowienie mejozy zatrzymanej na etapie profazy I podziału mejotycznego. Po „piku” LH pęka błona jądrowa, co efektywnie zatrzymuje transkrypcję i oocyt ponownie rozpoczyna mejozę, która zostaje zakończona w metafazie drugiego podziału redukcyjnego [141, 148]. Należy jednak zaznaczyć, iż sam oocyt nie może reagować z LH, ponieważ nie posiada odpowiednich receptorów [95]. Dlatego też wydaje się, iż promujące działanie LH na dojrzewanie oocytu odbywa się poprzez indukcję syntezy czynników wzmagających (np. progesteronu) lub inhibicję czynników hamujących ten proces. Supresyjnie na dojrzewanie oocytu wpływa grupa polipeptydów określanych jako OMI (*Oocyte Meiosis Inhibitors*), cAMP, hipoksantyna i niektóre czynniki wzrostowe [141, 148]. Większość z tych substancji przechodzi do oocytu z komórek ziarnistych poprzez międzykomórkowe złącza szczelinowe (*gap junction*). Po wyrzucie LH następuje przerwanie kontaktu oocytu z otaczającymi go komórkami ziarnistymi uniemożliwiając tym samym przenikanie substancji hamujących mejozę. Interesujące, iż obniżenie stężenia wewnątrzkomórkowego cAMP jest jednym z najważniejszych sygnałów rozpoczęcia podziału mejotycznego oocytu. Nie wykluczone zatem, że brak receptorów dla LH jest ochroną oocytu przed podwyższonym stężeniem cAMP. Opublikowane ostatnio badania przez Jablonka i wsp. [68] zwracają uwagę na istotną rolę tlenu azotu w modulacji dojrzewania mejotycznego oocytu.

Równoległe z dojrzewaniem oocytu i rozproszeniem komórek ziarnistych, po „piku” LH zachodzą dynamiczne zmiany naczyniowe przejawiające się zwiększonym wzrostem przepływu krwi przez cały jajnik i przekrwieniem pęcherzyka owulacyjnego. W obrębie pęcherzyka ściany naczyń włosowatych rozszerzają się, zwiększa się ich przepuszczalność w następstwie czego powstaje obrzęk [41]. Uważa się, iż za przekrwienie całego jajnika odpowiedzialna jest histamina, uwalniana z komórek tucznych zlokalizowanych wokół naczyń krwionośnych wnęki jajnika, natomiast za obrzęk otoczki zewnętrznej pęcherzyka czynnik aktywujący płytki (PAF) [126]. Oprócz histaminy do czynników powodujących wzrost przepuszczalności naczyń i

zwiększających przepływ naczyniowy należą: bradykinina, prostaglandyna E<sub>1</sub> (PGE<sub>1</sub>), tlenek azotu, cytokiny, leukotrieny [95]. Prawdopodobnie w procesie owulacji uczestniczy także angiotestyna II powstająca miejscowo z proreniny, obecnej w płynie pęcherzykowym, której stężenie rośnie podczas „piku” LH [69]. W fazie poprzedzającym owulację istotne zmiany naczyniowe zachodzą w obszarze wierzchołkowym (*apex*) pęcherzyka. W miejscu tym, w przeciwieństwie do przekrwionej reszty pęcherzyka zauważono utratę ciągłości naczyń, co próbuje się tłumaczyć anemizacją tego regionu. Sądzi się, iż szybkie powiększanie się pęcherzyka, spowodowane gromadzeniem się płynu pęcherzykowego, może prowadzić do rozciągania jednych naczyń, a ścieśniania innych, zwłaszcza tych położonych w części apikalnej i ograniczonych sztywną błoną białawą. Rezultatem tego jest zmniejszenie dopływu krwi, niedokrwienie, zblednięcie i powstanie plamki jasnej (*macula pellucida*). Sugeruje się także, iż powyższe zmiany spowodowane są powstaniem mikrozakrzepów bądź nowych połączeń tętniczo-żylnych [150], a także skurczem komórek mięśni gładkich otoczki [69]. Przypuszcza się, iż za zjawisko niedokrwienia w obszarze wierzchołkowym odpowiedzialne są między innymi prostaglandyny [148, 150].

Rozpatrując zmiany naczyniowe w owulacyjnym pęcherzyku należy podkreślić, iż odgrywają one istotną rolę nie tylko w samym procesie owulacji ale również w procesach związanych z przekształcaniem się jego komórek składowych w ciało żółte [95].

Krótko przed owulacją na wystającej części pęcherzyka pojawia się zagłębienie zwane stigmą, które stanowi miejsce pęknięcia ściany pęcherzyka. Do niedawna panował pogląd, iż pęknięcie dojrzałego pęcherzyka spowodowane jest wzrostem ciśnienia płynu pęcherzykowego. Wydaje się, iż w świetle nowszych danych hipoteza mechanicznego rozerwania ściany pęcherzyka nie znajduje pełnego potwierdzenia [148]. Ciśnienie płynu pęcherzykowego kompensowane jest bowiem przez siły elastyczności ściany pęcherzyka [150]. Najbardziej akceptowaną obecnie teorią jest enzymatyczny mechanizm owulacji, w którym istotną funkcję pełnią enzymy proteolityczne. W miejscu pęknięcia pęcherzyka zachodzi bowiem enzymatyczne trawienie elementów łącznotkankowych osłonki związane z degradacją kolagenu i zmianami w macierzy pozakomórkowej. Kaskada proteolityczna w tej tkance zainicjowana zostaje przedowulacyjnym wyrzutem lutropiny. Hormon ten, za pośrednictwem kinazy białkowej A, uaktywnia w komórkach warstwy ziarnistej aktywator plazminogenu, który powoduje przekształcenie obecnego w płynie

pęcherzykowym plazminogenu w plazminę. Ta z kolei czynnia nieaktywną formę kolagenazy, której aktywność narasta aż do momentu pęknięcia pęcherzyka. Działanie kolagenazy ułatwione jest przez rozsuniecie włókien kolagenowych powodowane narastaniem objętości płynu pęcherzykowego. Synteza kolagenazy stymulowana jest również w takich komponentach jak fibroblasty, nabłonek powierzchniowy i makrofagi, a oprócz LH do czynników wzmagających jej aktywność należą prostaglandyny, leukotrieny, hormony sterydowe, FSH [41, 69]. Panuje pogląd, iż działanie hormonów sterydowych i FSH w powyższych reakcjach polega na stymulacji produkcji aktywatora plazminogenu, podczas gdy udział prostaglandyn i leukotrien nasila się na etapie aktywacji prokolagenazy [69].

Należy zaznaczyć, iż procesy proteolityczne zachodzące podczas owulacji dotyczą nie tylko destrukcji tkanki łącznej osłonki pęcherzyka, ale również zmian degeneracyjnych błony białawej oraz leżącej pod nią tkanki zrębu, a także nabłonka powierzchniowego pokrywającego jajnik [95]. W procesach tych rozważa się udział czynnej biologicznie plazminy [146], której uwalnianie stymulowane jest między innymi przez prostaglandynę  $F_{2\alpha}$  ( $PGF_{2\alpha}$ ) [69].

Warto w tym miejscu podkreślić, iż funkcja prostaglandyn w owulacji jest wielostronna. Wpływają one na zmiany naczyniowe, proliferację fibroblastów, chemotaksję leukocytów, uczestniczą w procesach proteolitycznych, obniżają napięcie ściany pęcherzyka i wzmagają kurczliwość mięśni gładkich w obrębie osłonki zewnętrznej pęcherzyka [41, 150]. Na czynność skurczową pęcherzyka wpływa ponadto unerwienie jajnika [41].

W tak dynamicznych procesach jak owulacja, wiele reakcji przebiega równocześnie i trudno scharakteryzować sekwencję poszczególnych zjawisk. Wiadomo jednak, że skurcze komórek mięśniowych osłonki są czynnikiem wspomagającym owulację. Prowadzą one do obkurczenia podstawy pęcherzyka, co powoduje jego wypchanie na podstawę jajnika i rozciąganie jego części apikalnej, osłabionej już działaniem enzymów proteolitycznych. Po owulacji skurcze mięśniówki powodują przyłgnięcie ściany byłego pęcherzyka i zatrzymanie jego pozostałości.

Wyniki badań w zakresie czasowych zależności dotyczących usunięcia komórki jajowej z pęcherzyka przedstawił Talbot [151]. W badaniach na wyizolowanych pęcherzykach chomika zaobserwował dwufazowe usuwanie oocytu. W pierwszej fazie trwającej kilkadziesiąt sekund dochodzi do wyparcia komórki jajowej wraz z wieńcem promienistym, natomiast w drugiej, trwającej kilka minut, następuje całkowite

usunięcie zawartości antrum. Do jajowodu uwalniana jest zatem nie tylko komórka jajowa z komórkami wieńca promienistego, ale również część płynu pęcherzykowego. U większości ssaków minimalny czas przebywania komórki jajowej w środowisku jajowodu wynosi około 4 godzin. Dopiero po tym czasie oocyt osiąga zdolność do zapłodnienia, która utrzymuje się zaledwie kilka godzin. Jeżeli w tym okresie nie dojdzie do zapłodnienia, w komórce jajowej rozpoczynają się zmiany degeneracyjne, trwające do 96 godziny od momentu owulacji [95]. Istnieją doniesienia sugerujące, że proces ten przebiega na drodze apoptozy [140].

Jak wynika z powyższych rozważań zmiany naczyniowe, metaboliczne i strukturalne zainicjowane przedowulacyjnym „pikiem” LH związane są z destrukcją, przebudową pęcherzyków i ze śmiercią licznych komórek, a sama owulacja pod wieloma względami wykazuje cechy ostrej reakcji zapalnej. Wokół przedowulacyjnych pęcherzyków gromadzą się limfocyty, makrofagi, neutrofile, eozynofile, bazofile, co jest jednym z komponentów reakcji zapalnej. Komórki te migrują do przedowulacyjnego pęcherzyka w wyniku chemotaksji, która też jest nieodłączną właściwością odpowiedzi immunologicznej. Badania ostatnich lat dostarczyły dowodów, iż silnymi chemoatraktantami dla leukocytów w czasie owulacji są chemina  $GRO\alpha$  [80], czynnik stymulujący kolonie granulocytarno-makrofagowe (GM-CSF), interleukina-8 (IL-8) i czynnik nekrotyzujący guzy- $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) [95]. Pęcherzykowa chemotaksja stymulowana jest początkowo przez LH, a w miarę wzmaganej migracji komórek immunologicznych również przez cytokiny będące ich produktem. W procesach zapalnych i w owulacji rola cytokin jest podobna. Oprócz działania chemotaktycznego i cytotoksycznego, glikoproteiny te włączone są w produkcję proteaz, prostaglandyn i tlenku azotu, które z kolei uważane są za ważne mediatory zapalenia [20, 95]. Ponadto, zarówno w procesie zapalnym, jak i w czasie owulacji dochodzi do wzmożonej proliferacji fibroblastów i zachodzą podobne zmiany w mikrokrążeniu. Zmiany te prowadzą do przekrwienia, a w wyniku wzrostu przepuszczalności naczyń do powstania obrzęku. Mediatorem tych zmian jest histamina, której zwiększone uwalnianie obserwuje się w początkowych etapach obu procesów [41].

Jedną z konsekwencji procesu zapalnego jest ograniczenie czynności tkanki zapalnej, co w odniesieniu do owulującego pęcherzyka może dotyczyć zahamowania aktywności aromatyzacyjnej i zmiany kierunku steroidogenezy. Według danych przedstawionych

przez Espeya [41] w czasie owulacji następuje obniżenie aktywności steroidogennej pęcherzyka, który wchodzi w tym okresie w stan „uśpienia”.

Interesujące są również podobieństwa między końcowymi etapami procesu zapalnego a tworzeniem się ciała żółtego. Procesy naprawcze w obrębie uszkodzonych tkanek zapalnych polegają na ograniczeniu ogniska zapalnego formowanym przez protrombinę i fibrynogen skrzepem, na waskularyzacji i włóknieniu. Wszystkie te zjawiska towarzyszą genezie ciała żółtego. Po owulacji w jamie pękniętego pęcherzyka powstaje skrzep, do którego wrasta tkanka łączna i wnikają liczne naczynia krwionośne [146].

Porównując owulację do procesu zapalnego należy zaznaczyć, iż miejscowym reakcjom zapalnym mogą towarzyszyć reakcje uogólnione, takie jak gorączka, podwyższona leukocytoza, zaburzenia metaboliczne, zmiany stężeń niektórych białek osocza, ból. Na temat kształtowania się temperatury ciała w okresie okołowulacyjnym interesujące wyniki przedstawił Jaśkowski [39]. Cytowany autor w doświadczeniu na jałówkach stwierdził dodatnią korelację pomiędzy „pikiem” LH, owulacją a temperaturą ciała. Brak jest natomiast danych w zakresie pozostałych wymienionych reakcji ogólnoustrojowych, które ewentualnie mogą towarzyszyć owulacji wykazującej na wielu etapach podobieństwo do procesu zapalnego. Nie oznacza to jednak, że procesy te są identyczne. Zasadnicza różnica dotyczy czynników uruchamiających odpowiedź immunologiczną. Reakcje zapalne obserwowane w przebiegu owulacji nie są bowiem spowodowane czynnikami patogennymi, lecz zainicjowane gwałtownym wyrzutem lutropiny. Proces owulacji jest zatem fascynującym zjawiskiem regulowanym szczególnym powiązaniem między układem neuroendokrynnym a immunologicznym.

### 3. MONITOROWANIE OWULACJI

Opierając się na przeobrażeniach zachodzących podczas okresu okołowulacyjnego opracowano szereg metod pozwalających z większą lub mniejszą dokładnością określić termin owulacji. Możliwie precyzyjne wyznaczenie czasu owulacji ma istotne znaczenie, gdyż pozwala na ustalenie odpowiedniego czasu krycia czy inseminacji.

Do metod pośrednich należy analiza zmian profilu hormonów płciowych we krwi, z których za najbardziej wiarygodną uważa się monitorowanie „piku” LH. Istnieje wiele

doniesień wskazujących na wysoką korelację między falą LH a wystąpieniem owulacji [9, 44, 134]. Określenie czasu owulacji w oparciu o stężenie LH we krwi wymaga jednak znajomości odstępu czasu w jakim wyrzut tego hormonu poprzedza pęknięcie pęcherzyka jajnikowego. Jak już wspomniano, czas ten dla danego gatunku zwierząt jest względnie stały, ale występują różnice rasowe. Metoda ta wymaga zatem zbadania w odniesieniu dla danej rasy.

Z badań hormonalnych, które mogą być wykorzystane w monitorowaniu okresu okołowulacyjnego należy wymienić oznaczenia stężeń 17- $\beta$ -estradiolu [173]. Jednakże wzrost poziomu tego sterydu we krwi można traktować jedynie jako sygnał rui a nie samej owulacji. Dlatego też dla oceny jajnikowej aktywności często bazuje się na zmianach stężeń progesteronu [44, 105], którego poziom w okresie okołowulacyjnym u kóz znacznie spada [29, 88]. O przebytej zaś owulacji może świadczyć wzrost poziomu progesteronu będący wynikiem aktywności powstałych ciałek żółtych [33].

Ujemną stroną oznaczeń hormonalnych jest to, iż wymagają seryjnych pomiarów. Istnieje bowiem zgodność poglądów, że pojedyncze oznaczenie nie jest dostatecznym dowodem potwierdzającym przedowulacyjny stan samicy. Istotne też są koszty związane z oznaczeniem poziomu hormonów. W związku z powyższym pomocne mogą być badania opierające się na zmianach wynikających z biologicznego oddziaływania hormonów płciowych na organizm. Do badań tych należą ocena śluzu szyjkowego oraz stopnia jego krystalizacji, wymazy cytohormonalne, pomiar temperatury ciała [71, 173]. Wszystkie wymienione metody oparte na rytmie uwalniania hormonów pozwalają jedynie na prawdopodobne określenie lub przewidywanie owulacji. Pewne rozpoznanie owulacji możliwe jest tylko przez bezpośrednią obserwację struktur jajnikowych z wykorzystaniem ultrasonografii i endoskopii. Techniki te szeroko stosowane w medycynie ludzkiej, w ostatnich latach znalazły zastosowanie również w diagnostyce weterynaryjnej. Za pomocą metody USG badanie jajników dokonuje się najczęściej drogą doprostopniczą [26, 46, 139]. U kóz podobnie jak u bydła owulację określa się na podstawie deformacji i zapadania się ścian pęcherzyka oraz uformowania się ciała żółtego [139]. Max i wsp. [103] stosując tę metodę u jałówek jako dzień jajczkowania przyjęli ten, w którym po raz ostatni w obrazie ultrasonograficznym widoczny był duży pęcherzyk. Ultrasonografia jest badaniem nieinwazyjnym, ale technika ta wymaga dużego doświadczenia i umiejętności diagnozowania badanych struktur na monitorze.

W monitorowaniu owulacji u kóz istnieje również możliwość wykorzystania endoskopii, o czym świadczą badania Mori i Kano [114]. Stosując tę technikę przy

równoczesnym określeniu profilu LH i P<sub>4</sub>, cytowani autorzy uzyskali wartościowe wyniki dotyczące zależności czasowych między zmianami hormonalnymi a owulacją u kóz rasy Shiba.

Rozwój techniczny endoskopii znacznie zwiększył zakres jej stosowania. Do nowoczesnych technik endoskopowych należy laparoscopia umożliwiająca oglądanie powierzchni jajnika za pomocą laparoskopu, wprowadzonego do jamy brzusznej, po uprzednim wypełnieniu jej powietrzem. Konstrukcja przyrządu pozwala również na fotografowanie wybranych miejsc, a także obserwację zachodzących zmian, na podłączonym monitorze. W czasie laparoskopii można zarejestrować dokładny moment jajczkowania jak również określić wskaźnik owulacji [32, 98]. Podczas badania możliwe jest też pobranie komórki jajowej celem jej zapłodnienia *in vitro*, co pozwala na wykorzystania laparoskopii w biotechnologii rozrodu. U kóz laparoscopia znalazła zastosowanie przy pozyskiwaniu oocytów i embrionów, a także w transferze zarodków [87].

Laparoscopia uważana jest za metodę mało inwazyjną pozwalającą na ocenę badanych struktur bez konieczności otwierania jamy brzusznej. Niemniej wykonanie zabiegu wymaga zastosowania lekkiego znieczulenia ogólnego i unieruchomienia zwierzęcia w odpowiedniej pozycji. W celu zminimalizowania ilości zabiegów niektórzy autorzy proponują by obserwację laparoskopową rozpocząć nie wcześniej niż przed „pikiem” LH, najlepiej kiedy zwierzę jest w środkowym etapie rui [135]. Należy również podkreślić, iż zabieg musi być wykonany przez lekarza weterynarii o dużym doświadczeniu z zakresu diagnostyki laparoskopowej narządu rodno samicy. W związku z powyższym, monitorowanie owulacji z wykorzystaniem laparoskopii, aczkolwiek z naukowego punktu widzenia bardzo wartościowe, nie może być traktowane jako rutynowe.

W określeniu owulacji w praktyce najczęściej bazuje się na zmianach rujowych. Panuje pogląd, że jajczkowanie u kóz następuje między 24 a 36 godziną od ich rozpoczęcia [70]. Istnieją jednak doniesienia, iż czas owulacji względem początku rui jest wartością zmienną wahającą się od 9 do 37 godzin [135]. Występują także różnice osobnicze dotyczące intensywności zmian rujowych. Dość częstym zjawiskiem jest występowanie tzw. cichych rui, co nie oznacza, że u zwierząt z osłabionymi objawami rujowymi nie zachodzi owulacja. Zdarza się też, iż u kóz przejawiających zwiększone libido jajczkowanie nie występuje [29]. Ponadto nie zawsze możliwe jest wychwycenie czasu wystąpienia pierwszych oznak rui, które często rozpoczynają się w godzinach nocnych.

Dlatego też, jednym z celów stosowania synchronizacji rui jest wyeliminowanie błędów związanych z jej wykrywaniem i ustaleniem terminu krycia. Zadaniem zaś ośrodków badawczych jest określenie limitów czasowych dotyczących owulacji i krycia w konkretnej metodzie synchronizacji rui, nie tylko dla danego gatunku, ale również dla rasy. Dopiero wtedy wdrażanie odpowiedniego programu może dać oczekiwane efekty hodowlane.

#### 4. SEZONOWOŚĆ W ROZRODZIE

Jednym z najbardziej intrygujących aspektów procesów rozrodczych jest sezonowość w reprodukcji, zjawisko będące domeną głównie zwierząt dziko żyjących. Roczny rytm aktywności płciowej zapewnia tym zwierzętom wydanie na świat potomstwa w porze roku zwiększającej ich szansę na przeżycie. U dużych ssaków, żyjących w strefie klimatu umiarkowanego, pomimo zróżnicowania gatunkowego, młode rodzą się najczęściej wiosną. Zatem okres aktywności płciowej związany jest ściśle z długością ciąży i w zależności od tego występuje w określonej dla danego gatunku porze roku. Tak zaprogramowany genetycznie rytm w reprodukcji wymaga synchronizacji procesów rozrodczych ze zmieniającymi się warunkami klimatycznymi. Niewątpliwie, jest to możliwe dzięki wykształconym w toku ewolucji różnorodnym mechanizmom, pozwalającym na przewidywanie pór roku. Jednakże poznanie tych mechanizmów u zwierząt dziko żyjących jest utrudnione. Dlatego cennym obiektem obserwacji i badań są kozy i owce, które mimo udomowienia zachowały jeszcze sezonowe zmiany aktywności płciowej. Podłożem wielu badań są także próby przełamania bariery sezonowości, która u zwierząt hodowlanych jest zjawiskiem ujemnym, ograniczającym efektywne wykorzystanie ich potencjału rozrodczego i limitującym wydajność produkcyjną [159, 161, 162].

Kozy należą do zwierząt sezonowo poliestralnych, u których sezon rozrodczy przypada na okres skracającego się dnia świetlnego. U większości ras hodowanych w naszej szerokości geograficznej, sezon rozrodczy rozpoczyna się w miesiącach letnio-jesiennych, a kończy w miesiącach zimowo-wiosennych [29]. W okresie tym, trwającym od 150 do 200 dni, zwierzęta wykazują wzmożoną aktywność płciową połączoną z cyklami owulacyjnymi u samic [30] i z nasiloną czynnością gametotwórczą u samców [64, 162].



Roczne zmiany w amplitudzie dnia świetlnego odgrywają zatem istotną rolę w sezonowej regulacji funkcji rozrodczych. Wykazano, że wzrost długości dnia na wiosną hamuje aktywność seksualną kóz i uczula je na krótki dzień. Rola dnia krótkiego polega natomiast na stymulowaniu aktywności płciowej oraz na podtrzymywaniu zakodowanej genetycznie długości sezonu rozrodczego [30]. Taki rytm w rozrodzie wskazuje, że sezonowe zmiany w reprodukcji zależą nie tylko od zmian w fotoperiodzie, ale także od endogenego, okołorocznego zegara biologicznego [29].

W latach osiemdziesiątych stało się oczywistym, iż głównym narządem pośredniczącym w przekazywaniu informacji o długości dnia do organizmu jest szyszynka. Gruczoł ten, poprzez wydzielanie melatoniny, przekazuje informacje o cyklu światło-ciemność i przez to odpowiedzialny jest za występowanie sezonowych zmian w reprodukcji. U wszystkich, przebadanych dotychczas ssaków, synteza i wydzielanie melatoniny występuje zawsze w godzinach nocnych [78]. U kóz i owiec gwałtowny wzrost produkcji melatoniny obserwuje się już w ciągu 30 minut od zapadnięcia ciemności, który ulega szybkiemu wygaszeniu dopiero przed nastaniem świtu. Czas trwania wysokich poziomów melatoniny jest niemal identyczny jak długość nocy [30]. Niskie poziomy melatoniny to sygnał dnia, wysokie to sygnał nocy. Stopniowe „rozszerzanie” czy „zwężanie” zakresu podniesionego poziomu melatoniny odczytywane jest jako znak pór roku [159].

Światło jest najważniejszym czynnikiem regulującym rytm biosyntezy melatoniny. Najsilniejsze działanie hamujące na jej wytwarzanie wywiera światło zielone, a najslabsze czerwone. Do szyszynki informacja świetlna dociera wyłącznie drogą nerwową, którą rozpoczyna proces fotorecepcji w siatkówce oka. Następnie droga ta biegnie nerwami wzrokowymi poprzez ich skrzyżowanie do jąder nadskrzyżowaniowych podwzgórza (SCN), pełniącego rolę nadrzędnego oscylatora okołodobowego organizmu. Stąd impuls w formie potencjałów aktywności dociera szlakiem wieloneuronalnym do zazwojowych włókien współczulnych, unerwiających pinealocyty. W nocy dochodzi do aktywacji elektrycznej tych włókien, w wyniku czego następuje zwiększone wydzielanie z ich zakończeń noradrenaliny. W konsekwencji dochodzi do wzrostu wewnątrzkomórkowego cAMP, który uruchamia kaskadę reakcji biochemicznych prowadzących do indukcji N-acetylotransferazy (NAT), enzymu pełniącego kluczową rolę w syntezie melatoniny. Wraz z nadejściem świtu gwałtownie spada ilość noradrenaliny, obniża się aktywność NAT i dochodzi do zahamowania syntezy melatoniny [122, 172].

Zsyntetyzowana w szyszynce melatonina zostaje pulsacyjnie uwolniona do krwi i płynu mózgowo-rdzeniowego i tą drogą dociera do różnorodnych tkanek i komórek organizmu, gdzie wywiera swoje działanie fizjologiczne [12]. Warto zaznaczyć, iż szyszynka tylko w minimalnym stopniu magazynuje wyprodukowaną melatoninę, tak że poziom tego hormonu we krwi obwodowej odzwierciedla intensywność jego syntezy [122].

Dokładna droga oddziaływania melatoniny na komórki docelowe nie została poznana. Przyjmuje się, że miejscem jej oddziaływania są różne obszary mózgu. Receptory melatoninowe wykryto m.in. w części guzowatej przysadki (*pars tuberalis*) i w jądrach nadskrzyżowaniowych podwzgórza [81, 109]. Część guzowata przysadki mózgowej to jedyny obszar mózgu, gdzie stwierdzono receptory melatoninowe u wszystkich przebadanych ssaków. Uważa się, że to właśnie *pars tuberalis* odgrywa kluczową rolę w regulacji procesów fizjologicznych zależnych od pór roku, podczas gdy SCN uważany jest za centralny rozrusznik rytmów okołodobowych [159].

Interesujące są zatem doniesienia z zakresu udziału szyszynki w kontroli sezonowych zmian w reprodukcji. Istnieją przesłanki by sądzić, iż roczne zmiany w profilu uwalniania melatoniny uczestniczą w indukcji zakodowanej wrażliwości na długość dnia [78]. Panuje też pogląd, że hormon ten wpływa na aktywność płciową poprzez kontrolę uwalniania gonadotropin. Dlatego też, większość koncepcji wiąże się z wpływem melatoniny na sezonowe zmiany w uwalnianiu hormonów przysadkowych. Najbardziej przekonująca hipoteza sugeruje możliwość oddziaływania melatoniny na komórki neurosekrecyjne uwalniające GnRH [109]. Kennaway i Rowe [81] przedstawili silny argument przemawiający za tą koncepcją, wskazując na interakcję melatoniny z nerwową transglutaminazą przy synapsach neuronów uwalniających GnRH. Autorzy w oparciu o wyniki swoich badań na owcach sugerują, iż konsekwencją tej interakcji mogą być sezonowe zmiany w plastyczności neuronów GnRH. Taka droga działania melatoniny jest bardzo prawdopodobna, tym bardziej, że badania ostatnich lat nad mechanizmami kontrolującymi funkcje rozrodcze u owiec i kóz świadczą o tym, iż przejście z anestrus do okresu rozrodczego i odwrotnie uzależnione jest od wrażliwości generatora pulsów GnRH na oddziaływanie zwrotne estradiolu [153]. Zgodne z koncepcją Karscha [78, 79], istnieje zależność pomiędzy pulsującym wydzielaniem GnRH i LH, ujemnym sprzężeniem zwrotnym estradiolu i długością dnia. U kóz i owiec okres anestralny wiąże się ze wzrostem odpowiedzi GnRH i LH na ujemne sprzężenie zwrotne estradiolu. Natomiast w sezonie rozrodczym następuje osłabienie tego

sprzężenia, dzięki czemu wzrasta częstotliwość pulsów GnRH i LH i dochodzi o przedowulacyjnego wyrzutu LH prowadzącego do owulacji [78]. Wartym odnotowania są również sezonowe zmiany aktywności układu dopaminergicznego i noradrenergicznego [109].

Powyższe dane sugerują, iż ustalenie rocznych faz rozrodczych nie jest określane specyficznie przez rytm dobowy, lecz w pierwszej linii poprzez wrażliwość osi podwórzowo-przysadkowej na melatoninę. Można sądzić, iż wrażliwość ta podobnie, jak wrażliwość na długość dnia jest cechą wrodzoną. Wskazuje na to ontogeneza rytmu melatoniny i reakcji na fotoperiod w życiu płodowym i posnatalnym owiec i kóz [172].

Wartym odnotowania są też możliwości wykorzystania egzogennej melatoniny i (lub) programów świetlnych w indukcji sezonu rozrodczego. Podanie tego hormonu w okresie dnia długiego, przez co najmniej 40 dni, odbierane jest przez samicę w podobny sposób, jak bodziec krótkiego dnia świetlnego i powoduje przyspieszenie sezonu rozrodczego [31]. Należy jednak zaznaczyć, iż utrzymanie przez dłuższy czas aktywności cyklicznej poprzez reżimy świetlne lub terapię melatoninową nie jest możliwe, gdyż po jakimś czasie dochodzi do powstania stanu refrakcji i dominuje rytm roczny.

Z przeglądu literatury wynika, iż w warunkach fizjologicznych zjawisko refrakcji umożliwia przejście z okresu anestrального do sezonu rozrodczego i odwrotnie. W tych newralgicznych okresach rozważa się udział hormonów tarczycy i prolaktyny, których sekrecja wykazuje wyraźny rytm roczny [25].

Wśród tematyki badawczej, rozpatrującej związek tarczycy z sezonowością w rozrodzie, interesujące wyniki przedstawili Webster i wsp. [168]. Grupa powyższych badaczy ustaliła, że sezonowe zmiany uwalniania tyroksyny u owiec charakteryzują się najniższymi poziomami w lecie, tuż przed rozpoczęciem sezonu rozrodczego i najwyższymi zimą, w czasie poprzedzającym anestrus. Na jesieni następuje przejście od niskich poziomów do wysokich, natomiast wiosną od wysokich do niskich. Wykazano, że taki rytm uwalniania tyroksyny odgrywa ważną rolę w zmianie kierunku odpowiedzi GnRH i LH w ujemnym sprzężeniu zwrotnym na estradiol i utrzymaniu endogennej wrażliwości neurosekrecyjnej GnRH. Według cytowanych autorów podwyższony poziom tyroksyny, wpływając na wzrost sprzężenia zwrotnego, decyduje o czasie zakończenia sezonu rozrodczego i przejściu w okres anestralny. O fundamentalnej roli tarczycy w sezonowej reprodukcji świadczy również fakt, iż owce poddane strumektomii (wycięciu tarczycy) przejawiają cykle rujowe przez cały rok,

mimo zachowanego rytmu uwalniania melatoniny [168]. Do podobnych wniosków doszli O'Callaghan i wsp. [118], którzy stwierdzili, iż podawanie hormonów tarczycy w okresie jesiennym przyspiesza anestus i skraca sezon rozrodczy. Uwzględniając, że sezonowe zmiany w rozrodzie związane są z endogennym rytmem synchronizowanym przez fotoperiod, zastanawiające jest, jakie czynniki decydują o rocznym rytmie uwalniania tyroksyny? Nie ma jasno sprecyzowanej odpowiedzi na to pytanie, ale z dużym prawdopodobieństwem można przyjąć, że zależy on od panujących warunków środowiskowych, innych niż długość dnia świetlnego. Uważa się, że roczne zmiany stężeń tyroksyny powodowane są przez jakiś lokalny czynnik środowiskowy, który działa bezpośrednio na obwodowy metabolizm tyroksyny i trójdotyroniny nie wpływając na oś centralną. Wykazano bowiem, iż sezonowy rytm hormonów tarczycy, nie jest regulowany przez tyreoliberynę (TRH) i tyreotropinę (TSH), gdyż nie zanotowano rytmu rocznego w sekrecji tych hormonów. Stwierdzono ponadto interakcyjny wpływ temperatury na zmiany sekrecji hormonów tarczycy i osi reprodukcyjnej u chomika syryjskiego [132]. Należy również uwzględnić, iż tarczyca uczestniczy w termoregulacji organizmu, a zwiększone poziomy  $T_4$  i  $T_3$  obserwowane są w warunkach oziębienia [25]. Dlatego można przypuszczać, że roczne fluktuacje hormonów tarczycy mogą zależeć od zmian temperatury środowiska. Powyższe rozważania są przesłanką do sugestii, iż oprócz bodźców świetlnych również bodźce nieświetlne pełnią ważną rolę w synchronizacji endogenne, rocznego rytmu reprodukcyjnego z ze zmieniającymi się warunkami klimatycznymi. Według badań przeprowadzonych na jeleniach, należących podobnie jak kozy i owce do zwierząt „dnia krótkiego”, można sądzić, iż bodźce te działają niezależnie od siebie. Podawanie melatoniny samicom tego gatunku w sposób stymulujący dzień krótki lub długi nie miało bowiem wpływu na sezonowe zmiany stężeń  $T_3$  i  $T_4$  [23].

Podczas, gdy roczny rytm hormonów tarczycy wydaje się być niezależny od długości dnia świetlnego, to sezonowe zmiany sekrecji prolaktyny związane są ściśle z fotoperiodem [96, 111]. Ustalono, że uwalnianie tego hormonu wzrasta wraz z wydłużaniem się dnia świetlnego i maleje w czasie dni krótkich [96]. Stwierdzono ponadto, iż roczny rytm sekrecji prolaktyny może być modulowany przez melatoninę [125]. Jedną z hipotez zakłada, że melatonina wpływa na regulację wydzielania prolaktyny poprzez mechanizmy dopaminergiczne działające w obrębie podwzgórza i przysadki [110]. Panuje pogląd, że za kontrolę sezonowej aktywności komórek

laktotropowych odpowiada część guzowata przysadki [109], w której, jak już wspomniano, znajduje się największa ilość receptorów melatoninowych.

Niezależnie od rytmu melatoniny na uwalnianie prolaktyny wpływają także roczne zmiany temperatury, które modyfikują wpływ długości dnia na wydzielanie tego hormonu. Nie wykluczone, że ma to związek z sezonowymi, zależnymi od temperatury zmianami okrywy włosowej [49].

Znaczenie zaś rocznego rytmu prolaktyny w procesach rozrodczych budzi wiele kontrowersji i mimo ciągle rosnącej ilości danych nie można jasno zdefiniować funkcji tego hormonu w sezonowości rozrodu. Początkowo uważano, że wysokie stężenia prolaktyny w anestrus blokują w tym okresie aktywność jajnikową, podobnie jak ma to miejsce podczas laktacji. Jednakże badania polegające na farmakologicznym hamowaniu sekrecji prolaktyny poza sezonem rozrodczym nie potwierdziły tej koncepcji [96]. Podawanie bromokryptyny (agonisty dopaminy), które skutecznie redukowało stężenie prolaktyny we krwi nie wpływało bowiem na aktywność rozrodczą owiec [25]. Dlatego też obecnie wskazuje się na brak przyczynowego, bezpośredniego związku między sezonowymi zmianami sekrecji tego hormonu a sezonowością w rozrodzie [25, 125]. Nie wyklucza się jednak pośredniej roli prolaktyny, która jak podają Maeda i Mori [96] może polegać na wzmaganiu efektu dnia długiego. Mając na uwadze, że czas podwyższonego poziomu prolaktyny jest niemal identyczny jak czas trwania okresu anestralnego, powstaje pytanie, czy funkcja sezonowych zmian prolaktyny ogranicza się tylko do tego procesu? Aby odpowiedzieć na to pytanie należy rozpatrzyć inne możliwe drogi działania tego hormonu.

Wśród tematyki, związanej z rocznym rytmem rozrodczym na uwagę zasługują badania dotyczące sezonowych zmian aktywności ciała żółtego, a zwłaszcza znaczenia krótkich faz lutealnych pojawiających się w okresie poprzedzającym sezon rozrodczy [92, 96]. Panuje pogląd, iż krótkotrwały wzrost poziomu progesteronu może odgrywać ważną rolę w endokrynych mechanizmach wpływających na rozpoczęcie aktywności cyklicznej jajnika poprzez synchronizację pęcherzykowego dojrzewania z falą LH [90]. Z kolei w okresie przejścia z sezonu rozrodczego do anestrus normalne funkcjonowanie ciałek żółtych zostaje zahamowane. Przypuszczalnie powodem dysfunkcji lutealnej jest wzmożona luteoliza spowodowana podwyższoną produkcją PGF $2\alpha$  [90, 92]. Nie można zatem wykluczyć, iż jednym z elementów mechanizmu regulującego sezonowym rytmem rozrodczym są ewentualne zmiany wrażliwości endometrium macicy.

Jak widać z powyższych rozważań, w ostatnich latach zrobiono znaczny postęp w badaniach nad sezonowością w rozrodzie. Pozostaje jednak wiele zagadnień nie rozstrzygniętych, które budzą wciąż nowe koncepcje i stawiają cały szereg pytań oczekujących na odpowiedź. Wyjaśnienie tego zjawiska powinno doprowadzić do lepszego rozumienia synchronizacji procesów fizjologicznych ssaków z otaczającym je światem zewnętrznym.

## 5. SYNCHRONIZACJA RUI

Synchronizacja rui to wszelkie czynności hodowlane i farmakologiczne mające na celu pojawienie się rui i owulacji w jednakowym czasie u większości zwierząt. Główne korzyści wynikające ze stosowania synchronizacji rui, dotyczą ułatwień natury organizacyjnej i eliminacji błędów związanych z wykrywaniem rui i ustaleniem właściwego czasu krycia.

Metody synchronizacji rui muszą jednak spełniać szereg warunków. Stopień odpowiedzi zwierząt winien być odpowiednio wysoki, powinna być możliwość rozpoczynania synchronizacji w każdym stadium cyklu, czas rui winien być związany z czasem owulacji, zwierzęta powinny wykazywać normalną płodność, a kolejne ruje po synchronizacji również powinny być prawidłowe. Spełnienie wymienionych warunków decyduje o jakości stosowanej metody. U kóz i owiec dobór odpowiedniej metody synchronizacji rui uzależniony jest od rasy, wieku zwierząt, warunków utrzymania i sezonowych zmian aktywności płciowej. Należy również uwzględnić ocenę przydatności samic do rozrodu. Ptaszyńska [127] podkreśla, że zwierzęta wykazujące jakiegokolwiek zmiany patologiczne narządów rozrodczych nie powinny być poddawane zabiegom synchronizacji rui.

Większość metod synchronizacji rui opartych jest na możliwości stymulowania lub hamowania czynności ciała żółtego. Metodą polegającą na stymulowaniu fazy lutealnej jest podawanie związków progestagenowych, dzięki czemu utrzymywany jest ich odpowiedni poziom w organizmie blokujący aktywność gonadotropową przysadki, uniemożliwiając tym samym wystąpienie owulacji [77]. Możliwe jest stosowanie syntetycznego progesteronu w zastrzykach, implantach podskórnych czy preparatach doustnych [45]. Najczęściej jednak progestageny podaje się w postaci gąbek i wkładów dopochwowych [59, 77, 134]. Usunięcie gąbki powoduje wzrost wydzielania

gonadotropin, rozpoczyna się dojrzewanie pęcherzyków, czego następstwem jest owulacja. W celu pobudzenia wzrostu pęcherzyków podaje się PMSG (surowicę żrebnej klaczy), której działanie odpowiada działaniu FSH i w mniejszym stopniu LH. Okres półtrwania PMSG we krwi jest znacznie dłuższy niż FSH [3, 67]. Na podstawie dotychczasowych badań można stwierdzić, że stosowanie PMSG nie jest konieczne do wywołania rui w sezonie rozrodczym, jest natomiast niezbędnym warunkiem uzyskania rui poza sezonem [3, 108]. Zasób gonadotropin w komórkach wydzielniczych przysadki w tym okresie jest niewystarczający do wywoływania tak efektywnego ich wyrzutu jak w przypadku zwierząt będących w pełni sezonu rozrodczego [127]. Należy również wspomnieć, że PMSG jest szeroko stosowanym środkiem indukującym superowulację [3]. Ujemną stroną stosowania powyższej metody synchronizacji rui są niekiedy stany zapalne pochwy, będące skutkiem stosowania gąbek dopochwowych, jak również negatywne oddziaływanie progestagenów na przeżywalność i transport plemników w drogach rodnych samicy [72, 121]. Niemniej jednak metoda ta pozwala na uzyskanie 90% synchronizacji rui u owiec oraz około 65% płodności [76].

Druga metoda synchronizacji rui oparta jest na hamowaniu czynności ciała żółtego, poprzez spowodowanie jego luteolizy. Osiągnąć to można wieloma metodami, jednakże praktyczne zastosowanie znalazła tylko prostaglandyna  $F_{2\alpha}$  [121, 161]. Warunkiem powodzenia tej metody jest obecność czynnego ciała żółtego. Podanie  $PGF_{2\alpha}$  między 5 a 12 dniem cyklu wywołuje regresję CL [121], po której w określonym czasie następuje ruja i owulacja. Jest to metoda stosowana podczas sezonu rozrodczego u samic, które wykazują cykl rujowy. W przypadku braku pewności co do przebiegu cyklu stosuje się dwukrotną iniekcję prostaglandyny [160].

Jak już wcześniej wspomniano, w celu przyspieszenia sezonu rozrodczego istnieje możliwość wykorzystania melatoniny. Jednakże zastosowanie tej hormonu w naszym kraju należy raczej do metod perspektywicznych. Związane jest to z kosztami oraz z ograniczoną dostępnością egzogennej melatoniny na rynku.

W wywoływaniu rui wykorzystuje się również zmianę rytmu oświetlenia [162]. Jak podaje Karsch [78] fizjologiczne podłoże tej metody jest bardzo zbliżone do podawania egzogennej melatoniny. Skrócony dzień świetlny wpływa korzystnie także na wzrost wartości rozplodowej samców, poprzez zwiększenie zawartości testosteronu we krwi i fruktozy w nasieniu. Powyższe dane należy mieć na uwadze ingerując w procesy rozrodcze szczególnie w okresie anestrlnym. Sezonowość aktywności płciowej dotyczy bowiem nie tylko samic, ale również tryków i kozłów. I chociaż

zmiany te są dużo mniej zaznaczone należy dążyć, aby wykorzystywane do krycia samce wykazywały wyraźnie zaznaczone libido oraz odznaczały się dobrej jakości nasieniem [75].

Podczas naturalnego okresu rozrodczego przy synchronizacji rui pomocny jest tzw. efekt samca (ram effect). Nagłe wprowadzenie kozła do stada powoduje uwalnianie LH i wystąpienie owulacji u większości kóz [161]. Wydzielanie gonadotropin u samic stymulowane jest specyficznymi feromonami produkowanymi w gruczołach łojowych i potowych samca. W okresie rujowym wydzielanie feromonów jest nasilone i sygnalizuje o obecności samca w stadzie. Nie wyklucza się stosowania „efektu samca”, jako dodatkowego bodźca, także poza sezonem rozrodczym [133]. Kozły muszą być jednak w tym okresie odpowiednio przygotowane [120].

Nie ulega wątpliwości, że zwierzęta poddawane synchronizacji rui muszą być odpowiednio żywione [98]. Na poprawę płodności wpływa przede wszystkim dieta wysokobiałkowa o odpowiedniej zawartości makro i mikroelementów. Często wykorzystuje się tzw. flushing czyli wprowadzenie dawki pokarmowej o wyższej zawartości składników energetycznych i odżywczych tuż przed i po kryciu [127].

Wybór właściwej metody synchronizacji rui oraz spełnienie wszystkich warunków natury technicznej i organizacyjnej decydują o jakości i efektywności stosowanego programu synchronizacji rui i owulacji.



### III. CEL PRACY

#### 1. OGÓLNA CHARAKTERYSTYKA FERMY I UTRZYMANIE

##### ZWIĘZAT

1. Określenie dynamiki zmian stężeń hormonów płciowych i wybranych parametrów biochemicznych we krwi w okresie okołooowulacyjnym u kóz rasy anglo-nubijskiej poddanych synchronizacji rui w sezonie i poza sezonem rozrodczym;
2. Analiza wzajemnych zależności między badanymi cechami w okresie okołooowulacyjnym w aspekcie poznania przebiegu czynności rozrodczych i możliwości wykorzystania wyników w dalszych pracach nad regulacją cyklu rujowego u tego gatunku zwierząt;
3. Próba określenia dokładnego czasu owulacji na podstawie badanych parametrów oraz obserwacji laparoskopowej jajników i wyznaczenie na tej podstawie optymalnego terminu krycia kóz poddanych synchronizacji rui.

## IV. MATERIAŁ I METODY

### 1. OGÓLNA CHARAKTERYSTYKA FERMY I UTRZYMANIE ZWIERZĄT

Badania wykonano na fermie znajdującej się w Wołczkowie koło Szczecina (szer. geograficzna  $53^{\circ} 23'N$ ), w gospodarstwie nastawionym na produkcję mleka koziego. Utrzymywane tam kozy należą do rasy anglo-nubijskiej (z 25% dolewem rasy saaneńskiej), a stado podstawowe sprowadzono z Belgii w 1995 roku. Całe stado liczyło ok. 100 kóz, w tym 80 samic. Kozы przebywały w murowanym, adoptowanym na koziarnię budynku, zlokalizowanym na suchym terenie. Powierzchnia pomieszczenia, w którym znajdowały się samice wynosiła  $160m^2$ , przy stosunku powierzchni okien do podłóg 1:20. W koziarni wydzielono stanowisko dla matek z młodymi i stanowisko do doju, który prowadzono mechanicznie. Kozы przebywały w odrębnym pomieszczeniu, oddalonym o ok. 20m od budynku, w którym znajdowały się samice. Wszystkie zwierzęta utrzymywano na głębokiej ściółce i poddawano rutynowym zabiegom zootechnicznym, takim jak korekta racic, przycinanie rogów, odrobaczanie, czyszczenie sierści. Wiosenna zmiana okrywy włosowej występowała z największym nasileniem w miesiącu marcu, natomiast jesienna we wrześniu i październiku.

Kozy utrzymywano systemem alkierzowo-pastwiskowym, przy czym z pastwiska korzystały od maja, a przy sprzyjającej pogodzie już od kwietnia, do końca listopada. W żywieniu zimowym stosowano mieszankę treściwą (otręby pszenne, owies gnieciony, śruta jęczmienna, soja), siano łąkowe (mieszanki traw) i słomę jęczmienno-owsianą. Razem z paszą treściwą zwierzęta otrzymywały mieszankę mineralno-witaminową z ziołami „Polfamiks” i dodatkowo korę drzew (dębową, brzożową, sosnową). W okresie letnim stosowano te same pasze, ale podstawę stanowiło żywienie pastwiskowe. Wszystkie zwierzęta miały swobodny dostęp do wody (poidła automatyczne) i lizawek solnych.

W gospodarstwie oprócz głównej stanówki na przełomie września i października prowadzono także dodatkowe krycie części kóz na wiosną. W okresach poprzedzających stanówkę i w czasie stanówki zwierzęta żywiono standardowo, bez

zwiększanej dawki pokarmowej. Podawano natomiast, w formie iniekcji domięśniowej „Evetsel”, preparat zawierający selen i witaminę E.

## 2. TERMIN I HARMONOGRAM DOŚWIADCZENIA

Badania wykonano łącznie na 24 kozach, w wieku od 1,5 do 2,5 lat, o zbliżonej masie ciała (40-45kg). Zwierzęta przeznaczone do doświadczeń były w dobrej kondycji, wcześniej nie wykazywały nieprawidłowości w funkcjach rozrodczych, nie były w stanie laktacji.

Doświadczenie przeprowadzono w okresie jesiennym i wiosennym w ciągu dwóch lat. W każdym z tych okresów badaniem objęto 6 kóz, czyli doświadczenie wykonano na 4 oddzielnych grupach. Grupy te, w zależności od terminu przeprowadzonych doświadczeń oznaczono jako:

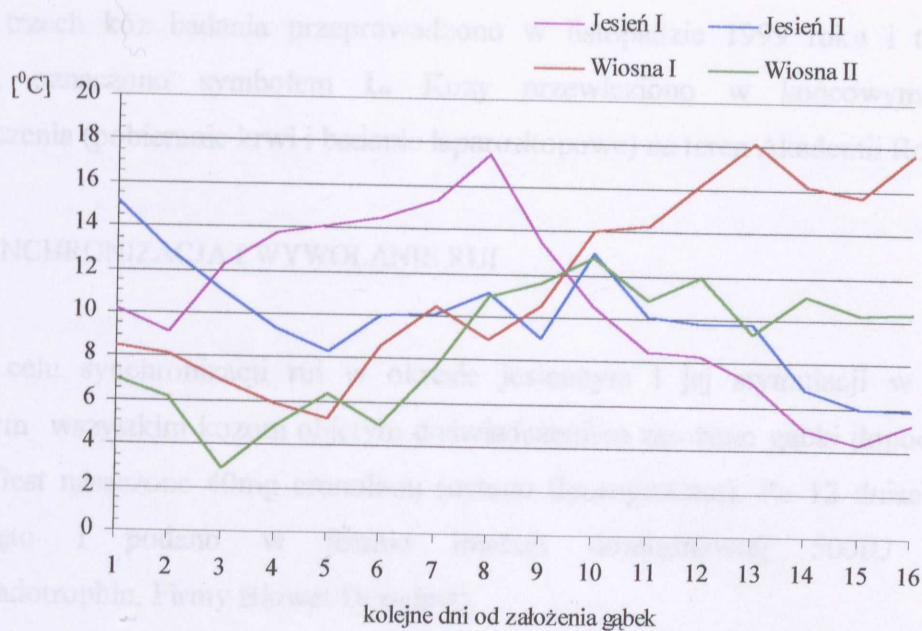
- ⊗ grupa **J<sub>1</sub>** - 6 kóz badanych w październiku 1997;
- ⊗ grupa **W<sub>1</sub>** - 6 kóz badanych w kwietniu 1998;
- ⊗ grupa **J<sub>2</sub>** - 6 kóz badanych w październiku 1999;
- ⊗ grupa **W<sub>2</sub>** - 6 kóz badanych w kwietniu 1999.

W trakcie doświadczenia zwierzęta przebywały razem z innymi kozami, a w czasie pobierania krwi przebywały w wydzielonym kojcu znajdującym się obok pozostałych kóz w stadzie. Żywiące były analogicznie jak pozostałe kozy w tym czasie, z tą różnicą, że w czasie pobierania krwi zamiast bezpośredniego korzystania z pastwiska otrzymywały koszoną, świeżą trawę.

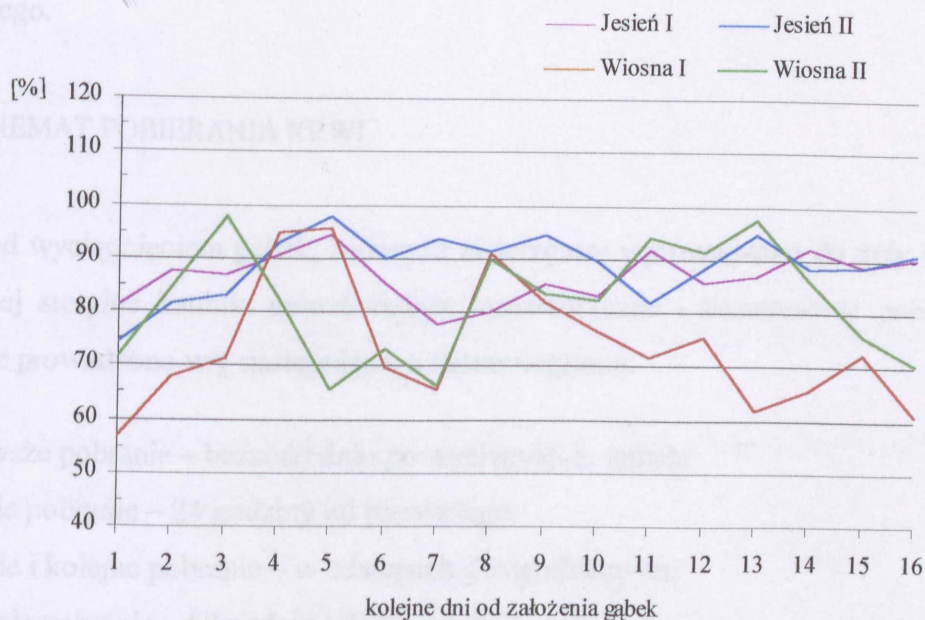
Dane dotyczące długości dnia świetlnego w czasie prowadzonych doświadczeń przedstawiono w tabeli 1.

**Tab. 1.** Długość dnia świetlnego w okresie badań

Data	Średnia długość dnia świetlnego	Wschód (godzina)	Zachód (godzina)
02 -17. 10. 97 (gr. <b>J<sub>1</sub></b> )	dzień -10h 9min. noc - 12h 7min.	6.02	16.40
02 -17. 10. 99 (gr. <b>J<sub>2</sub></b> )	dzień -10h 9min. noc - 12h 7min.	6.02	16.40
15 -30. 04. 98 (gr. <b>W<sub>1</sub></b> )	dzień -14h 2min. noc - 9h 4min.	4.09	18..59
15 -30. 04. 99 (gr. <b>W<sub>2</sub></b> )	dzień -14h 2min. noc - 9h 4min.	4.09	18..59



Ryc. 1. Temperatura powietrza w czasie prowadzonych badań



Ryc. 2. Wilgotność względna w czasie prowadzonych badań

Na wykresach przedstawionych na rycinach 1 i 2 przedstawiono kształtowanie się temperatury powietrza i wilgotności względnej w czasie prowadzonych badań w poszczególnych latach. Dane meteorologiczne podano na podstawie pomiarów przeprowadzonych w Stacji Meteorologicznej IMGM Szczecin Dąbie.

U trzech kóz badania przeprowadzono w listopadzie 1999 roku i tę grupę zwierząt, oznaczono symbolem L. Kozy przewieziono w końcowym etapie doświadczenia (pobieranie krwi i badanie laparoskopowe) na teren Akademii Rolniczej.

### 2.3. SYNCHRONIZACJA I WYWOŁANIE RUI

W celu synchronizacji rui w okresie jesiennym i jej stymulacji w okresie wiosennym wszystkim kozom objętym doświadczeniem założono gąbki dopochwowe Chrono-Gest nasączone 40mg cronolonu (octanu fluorogestonu). Po 12 dniach gąbki wyciągnięto i podano w formie iniekcji domięśniowej 500IU PMSG (Serogonadotrophin, Firmy Biowet Drwalew).

W każdym badanym okresie notowano czas wystąpienia pierwszych objawów rujowych opierając się na obserwacji wizualnej (zmiany w zachowaniu, zaczerwienienie i obrzmienie sromu, wyciek śluzu), a u zwierząt poddanych laparoskopii, w celu zminimalizowania ilości zabiegów, ruję określano na podstawie krystalizacji śluzu pochwowego.

### 2.2. SCHEMAT POBIERANIA KRWI

Przed wyciągnięciem gąbek, badanym zwierzętom wprowadzono do żyły szyjnej zewnętrznej sterylne kaniule umożliwiające systematyczne i bezstresowe pobieranie krwi, które prowadzono w/g następującego harmonogramu:

- ⌘ pierwsze pobranie – bezpośrednio po wyciągnięciu gąbek;
- ⌘ drugie pobranie – 24 godziny od pierwszego;
- ⌘ trzecie i kolejne pobranie – w odstępach dwugodzinnych;
- ⌘ ostatnie pobranie – 68 godzin od wyciągnięcia gąbek.

Krew w ilości 5 ml pobierano do heparynizowanych probówko-strzykawkę „Kabe” firmy Labortechnik. Po odwirowaniu oddzielone osocze przechowywano w temperaturze  $-20^{\circ}\text{C}$  do czasu wykonania oznaczeń badanych parametrów. W sumie od każdej kozy pobrano 24 próbki krwi.

W godzinach nocnych pobieranie krwi wykonywano przy słabym, miejscowym, czerwonym świetle.

### 3. BADANE PARAMETRY KRWI

W osoczu krwi pobranej od poszczególnych kóz w pierwszym roku doświadczenia, w sezonie i poza sezonem rozrodczym, czyli w grupie jesiennej ( $J_1$ ) i wiosennej ( $W_1$ ) określono stężenia następujących parametrów:

- » progesteronu ( $P_4$ )
- » 17- $\beta$ -estradiolu ( $E_2$ )
- » lutropiny (LH)
- » prolaktyny (PRL)
- » glukozy

W drugim roku doświadczenia, w grupie jesiennej ( $J_2$ ) i wiosennej ( $W_2$ ) wykonano te same badania poszerzając je o dodatkowe parametry:

- » melatoninę,
- » wolną tyroksynę ( $FT_4$ )
- » liczbę leukocytów
- » cholesterolu całkowitego
- » cholesterolu frakcji HDL
- » cholesterolu frakcji LDL

U kóz poddanych badaniu laparoskopowemu ( $L$ ) oznaczono stężenia lutropiny.

Stężenia wymienionych parametrów określono we wszystkich pobranych próbkach osocza krwi (bądź pełnej krwi).

#### 3.1. OZNACZANIE STĘŻEŃ HORMONÓW

Stężenie progesteronu, 17- $\beta$ -estradiolu, lutropiny, prolaktyny i melatoniny oznaczono metodą radioimmunologiczną. Zasada tej metody oparta jest na konkurencji między hormonem znakowanym izotopem promieniotwórczym a hormonem nie znakowanym zawartym w badanej próbce o ograniczoną ilość miejsc wiążących na cząsteczce przeciwciała. Ilość przeciwciał i hormonu znakowanego jest zawsze stała, zmienna jest tylko ilość badanego, nie znakowanego hormonu. Jeśli przeciwciało i

hormon znakowany są dodane do badanych próbek w stałej ilości, zawartość hormonu nie znakowanego jest funkcją tworzenia kompleksu przeciwciało-hormon znakowany. Na tej podstawie sporządza się krzywą standardową, na której odczytuje się stężenie hormonu w badanej próbce.

Oznaczenie stężenia wolnej tyroksyny wykonano metodą immunofluorescencyjną, która oparta jest na podobnej zasadzie jak metoda radioimmunologiczna, z tą różnicą, że zamiast izotopów promieniotwórczych wykorzystuje się zjawisko fluorescencji pierwiastków.

» **Progesteron i estradiol.** Stężenie tych hormonów oznaczono za pomocą zestawów firmy ORION DIAGNOSTICA produkcji fińskiej. Test ORION DIAGNOSTICA oparty jest na zasadzie metody podwójnych przeciwciał. Używa się w nim probówek typu SPECTRIA mających dolną powierzchnię opłaszczoną drugim przeciwciałem kozim anty-króliczym znakowanym  $^{125}\text{J}$ , na którym osadzone jest pierwsze królicze przeciwciało poliklonalne anty-progesteron lub odpowiednio anty-estradiol. Progesteron (estradiol) z próbki badanej i progesteron (estradiol) znakowany  $^{125}\text{J}$  po dodaniu do probówek SPECTRIA konkurują o miejsca wiążące na przeciwciale. Po dalszej procedurze dotyczącej inkubacji i płukania mierzy się pozostałą w probówkach radioaktywność.

» czułość zestawu, zdefiniowana jako wartość stężenia progesteronu odpowiadająca wartości trzech odchyłeń standardowych standardu zero, wynosi poniżej 0,09 ng/ml;

» czułość zestawu, zdefiniowana jako wartość stężenia estradiolu odpowiadająca wartości dwóch odchyłeń standardowych standardu zero, wynosi poniżej 5,45 pg/ml;

» błąd wewnątrzseryjny dla:

progesteronu przy wartościach poniżej 1 ng/ml – 5,8%, a powyżej – 4,2%

estradiolu przy wartościach poniżej 4,6 pg/ml – 18%, a powyżej – 2,8-5%;

» zakres krzywej kalibracyjnej dla:

progesteronu od 0 do 20,0 ng/ml, estradiolu od 0 do 408 pg/ml;

» pomiar radioaktywności - licznik promieniowania  $\gamma$  LBK WALLAC 1275 MINIGAMA produkcji fińskiej.

» **Lutropina.** Stężenie LH wykonano według metody opisanej przez Kosowicza [82]. Standard LH do jodowania i do krzywej kalibracyjnej – NIH OLH-S18. Przeciwciała LH/R-560 uzyskano w Instytucie Fizjologii i Żywienia Zwierząt w Jabłonnej k. Warszawy (IFiZZ).

- » czułość metody - 0,03ng/ml na próbkę;
- » błąd wewnątrzseryjny - 7,5%;
- » zakres krzywej kalibracyjnej wynosił od 0,3 do 40,0 ng/ml;
- » pomiar radioaktywności - licznik promieniowania  $\gamma$  COBRA III CANBERRA-PACKARD.

» **Prolaktyna.** Stężenie PRL wykonano według metody opisanej przez Kosowicza [82]. Standard do jodowania i do krzywej kalibracyjnej - A 71/222. Przeciwciała uzyskano w IFiZZ.

- » czułość metody - 2 ng/ml na próbkę
- » błąd wewnątrzseryjny - 9,0%
- » zakres krzywej kalibracyjnej wynosił od 3,2 do 400 ng/ml;
- » pomiar radioaktywności - licznik promieniowania  $\gamma$  COBRA III CANBERRA-PACKARD.

» **Melatonina.** Jako standard używano melatoninę chromatograficznie czystą firmy Sigma. Melatoninę znakowano trytem (Amersham). Przeciwciała uzyskano w School Sciences University of Surrey Guildford.

- » czułość metody -  $16 \pm 8,0$  pg/ml na próbkę;
- » błąd wewnątrzseryjny -  $10,0 \pm 1,3\%$ ;
- » zakres krzywej kalibracyjnej wynosił od 15,6 do 1000pg/ml;
- » pomiar radioaktywności - licznik promieniowania  $\beta$  BECMAN LS-6000TA.

» **Wolna tyroksyna.** Stężenie FT<sub>4</sub> oznaczono za pomocą zestawów DELFIA firmy PERKINELMER WALLAC produkcji fińskiej. Test DELFIA oparty jest na zasadzie metody podwójnych przeciwciał. W metodzie tej hormon znakowano europem (Eu<sup>+3</sup>).

- » czułość metody zdefiniowana jako wartość stężenia hormonu odpowiadająca wartości dwóch odchyień standardowych standardu zero, wynosi 1,6 pg/ml;
- » błąd wewnątrzseryjny przy wartościach poniżej 5,1pg/ml - 8,0%, a powyżej-4,5%;
- » zakres krzywej kalibracyjnej wynosił od 0 do 62,4 pg/ml
- » pomiar fluorescencji - fluorometr WALLAC 1420 VICTOR<sup>2</sup> produkcji fińskiej



### 3.2. OZNACZANIE STĘŻEŃ CHOLESTEROLU, GLUKOZY I OKREŚLENIE LICZBY LEUKOCYTÓW

⊗ **Cholesterol całkowity.** Stężenie cholesterolu całkowitego oznaczono przy użyciu zestawu CHOLESTEROL DST firmy ALPHA DIAGNOSTIC, metodą enzymatyczną, kolorymetryczną. Reakcje enzymatyczne wykorzystane w tej metodzie polegają na hydrolizie estrów cholesterolu (przez esterazę) do wolnych kwasów tłuszczowych i cholesterolu. Uwolniony cholesterol pod wpływem oksydazy jest utleniany do cholests-4en-3-onu i nadtlenu wodoru. Reakcja kolorymetryczna polega na wytworzeniu się czerwonego barwnika (chinonoiminy) po połączeniu się nadtlenu wodoru z 4-aminoantypiryną i HBA. Intensywność powstałego zabarwienia jest wprost proporcjonalna do stężenia cholesterolu w badanej próbce. Absorbancję mierzono na fotometrze EPOLL-20, przy długości fali 500nm. Wartość standardu wynosiła 300,0 mg/dl (7,8 mmol/l).

⊗ **Cholesterol frakcji HDL.** Stężenie cholesterolu frakcji HDL oznaczono przy użyciu zestawu HDL CHOLESTEROL firmy ALPHA DIAGNOSTIC, zawierający polietyloglikol (PEG) 6000. Odczynnik ten wytrąca wszystkie lipoproteiny oprócz lipoprotein wysokiej gęstości HDL, w której cholesterol oznacza się zestawem CHOLESTEROL DST (jak powyżej). Wartość standardu wynosiła 29 mg/dl (0,754 mmol/l).

⊗ **Cholesterol frakcji LDL.** Stężenie cholesterolu frakcji LDL obliczono według wzoru Friedewalda:

» cholesterol LDL (mmol/l) = cholesterol całkowity – chol. HDL – trójglicerydy/2,2

» W tym celu oznaczono stężenie **trójglicerydów** przy użyciu zestawu TRÓJGLICERYDY DST firmy ALPHA DIAGNOSTIC, metodą enzymatyczną, kolorymetryczną. Reakcje enzymatyczne polegają na hydrolizie trójglicerydów do wolnych kwasów tłuszczowych i glicerolu. Glicerol jest następnie fosforylowany, do glicerolo-3-fosforanu, który jest utleniany do fosfodwuhydroxyacetonu, uwalniając nadtlenek wodoru. Reakcja barwna polega na wytworzeniu się czerwonego barwnika (chinonoiminy) w wyniku połączenia nadtlenu wodoru z 4-aminoantypiryną i DHBS. Intensywność powstałego zabarwienia jest wprost proporcjonalna do stężenia

trójglicerydów w badanej próbce. Absorbancję mierzono na fotometrze Epoll-20, przy długości fali 520nm. Wartość standardu wynosiła 220,0 mg/dl (2,42 mmol/l).

⌘ **Glukoza.** Stężenie glukozy oznaczono metodą oksydazową przy użyciu zestawu GLUKOZA-OXY firmy ALPHA DIAGNOSTIC. Jest to metoda oparta na reakcji utleniania glukozy przez oksydazę połączoną z reakcją pomocniczą. W metodzie tej wykorzystano reakcję wytworzonego przy utlenianiu glukozy nadtlenku wodoru z 4-aminoantypiryną i HBA, w której powstaje chinonoimina. Intensywność zabarwienia jest wprost proporcjonalna do stężenia glukozy w próbce. Absorbancję mierzono na fotometrze EPOLL-20, przy długości fali 520nm. Wartość standardu wynosiła 200,0 mg/dl (11,12 mmol/l).

⌘ **Leukocyty.** Ilość leukocytów określano we krwi pełnej, metodą komorową. Badanie to wykonywano bezpośrednio po pobraniu krwi.

- » odczynnik - płyn Türka;
- » komora systemu Bürkera, mikroskop świetlny;
- » błąd tej metody szacuje się na 5-10%

#### 4. BADANIE LAPAROSKOPOWE

Badanie rozpoczęto w 50 godzinie od wyciągnięcia gąbek i powtarzano je czterokrotnie w odstępach 2-4 godzinnych w zależności od zmian zachodzących na jajnikach. Przed zabiegiem zwierzęta otrzymały środek znieczulający (2% Rometar). Badanie przeprowadził lekarz weterynarii z Centralnej Stacji Hodowli Zwierząt w Warszawie, o dużym doświadczeniu z zakresu diagnostyki laparoskopowej narządu rodnych samic zwierząt gospodarskich.

Przed rozpoczęciem zabiegu oceniano krystalizację śluzu. Materiał (śluz) pobierano za pomocą sterylnych bagietek drewnianych (wymazówek) z przyszyjkowej części pochwy i umieszczano na szkiełku podstawowym. Po wyschnięciu preparat oglądano pod mikroskopem i oceniano stopień krystalizacji w zależności od rozmiaru kryształków i zdolności tworzenia postaci paprociowatych. Ocenę krystalizacji śluzu traktowano jako badanie pomocnicze w rozpoznaniu rui i dlatego nie zostało ujęte w analizie wyników.

## 5. BADANIA STATYSTYCZNE

Otrzymane wyniki poddano analizie statystycznej, wykorzystując model wariancji jednoczynnikowej w układzie ortogonalnym. Dla badanych wskaźników wyliczono wartości średnie i odchylenia standardowe. Istotność różnic między grupami określano za pomocą testu t-Studenta i wielokrotnego testu rozstępu Duncana. Określono również współczynniki korelacji prostej między badanymi cechami w sezonie i poza sezonem rozrodczym. Obliczenia wykonano wykorzystując program komputerowy Statistica.

W pierwszym i drugim roku badań, pierwsze objawy rui zaobserwowano średnio w  $33 \pm 2,4$  godzinie, natomiast w sezonie wiosennym w  $37 \pm 3,2$  godzinie od momentu wyłęgnięcia gąbek. Międzysezonowe różnice dotyczyły również intensywności przebiegu rui. Na podstawie obserwacji zwierząt stwierdzono wyraźniejsze objawy rui w sezonie rozrodczym; lary przejawiały w tym czasie siliejsze pobudzenie, a ich zewnętrzne narządy płciowe były bardziej obrzmiałe i przekrwione niż w okresie anestrnym. Czas trwania rui u kóz w obu sezonach wyniósł średnio 28 godzin z wahaniami od 22 do 34 godzin.

## 2. ZMIANY STĘŻEŃ PROGESTERONU

Na rycinach 1 i 2 przedstawiono dynamiczny zmian stężeń progesteronu w kolejnych godzinach od wyłęgnięcia gąbek. Jeszcze w pierwszym i drugim roku badań (grupa  $J_1$  i  $J_2$ ) wykazywał stężenie  $P_1$  kształtowało się na zbliżonym poziomie i wynosiło odpowiednio  $0,53 \pm 0,28 \text{ ng/ml}$  i  $0,48 \pm 0,27 \text{ ng/ml}$ . Następnie nieznacznie się zmniejszało osiągając w grupie  $J_1$  minimalną wartość ( $0,37 \pm 0,1 \text{ ng/ml}$ ) w 52 godzinie, a w grupie  $J_2$  ( $0,31 \pm 0,04 \text{ ng/ml}$ ) w 56 godzinie od wyłęgnięcia gąbek. W grupie  $J_1$  w ostatnich godzinach stężenie  $P_2$  było podobne do początkowego ( $0,49 \pm 0,27 \text{ ng/ml}$ ), natomiast w grupie  $J_2$  wynosiło  $0,34 \pm 0,1 \text{ ng/ml}$ .

W okresie wiosennym poziom progesteronu u młodek wyłęgających gąbek wynosił w grupie  $W_1$  –  $0,22 \pm 0,06 \text{ ng/ml}$ , a w grupie  $W_2$  –  $0,28 \pm 0,06 \text{ ng/ml}$ . W kolejnych godzinach średnie stężenie w grupie  $W_1$  nieznacznie wzrosło osiągając w 56 godzinie poziom  $0,35 \pm 0,15 \text{ ng/ml}$ . W grupie  $W_2$  stężenie progesteronu w ostatniej godzinie wynosiło  $0,28 \pm 0,06 \text{ ng/ml}$ .

## V. WYNIKI

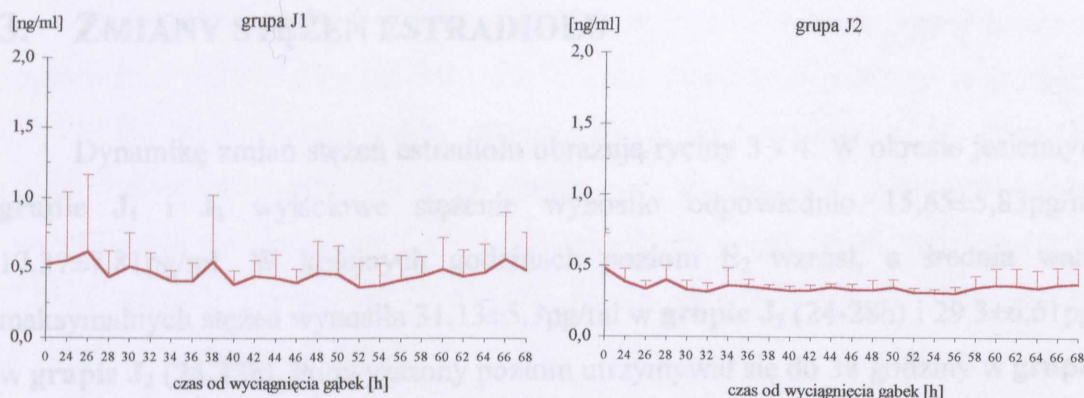
### 1. CZAS WYSTĄPIENIA RUI

Zastosowana stymulacja hormonalna polegająca na założeniu gąbek dopochwowych nasączonych progestagenem i iniekcji PMSG wywołała objawy rujowe u wszystkich kóz objętych doświadczeniem. W sezonie jesiennym zarówno w pierwszym jak i drugim roku badań, pierwsze objawy rui zaobserwowano średnio w  $33 \pm 2,4$  godzinie, natomiast w sezonie wiosennym w  $37 \pm 3,2$  godzinie od momentu wyciągnięcia gąbek. Międzysezonowe różnice dotyczyły również intensywności przebiegu rui. Na podstawie obserwacji zwierząt stwierdzono wyraźniejsze objawy rui w sezonie rozrodczym; kozy przejawiały w tym czasie silniejsze pobudzenie, a ich zewnętrzne narządy płciowe były bardziej obrzmiałe i przekrwione niż w okresie anestrалnym. Czas trwania rui u kóz w obu sezonach wynosił średnio 28 godzin z wahaniami od 22 do 34 godzin.

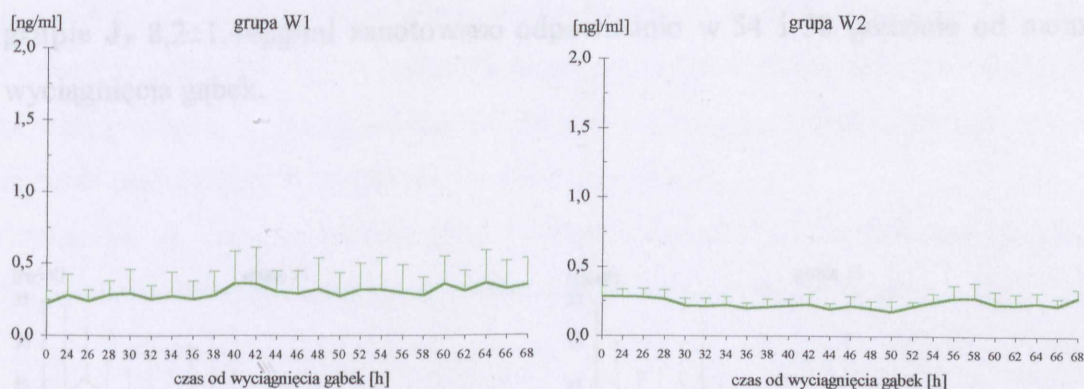
### 2. ZMIANY STĘŻEŃ PROGESTERONU

Na rycinach 1 i 2 przedstawiono dynamikę zmian stężeń progesteronu w kolejnych godzinach od wyciągnięcia gąbek. Jesienią w pierwszym i drugim roku badań (**grupa J<sub>1</sub>** i **J<sub>2</sub>**) wyjściowe stężenie P<sub>4</sub> kształtowało się na zbliżonym poziomie i wynosiło odpowiednio  $0,52 \pm 0,28$  ng/ml i  $0,48 \pm 0,27$  ng/ml. Następnie nieznacznie się zmniejszyło osiągając w **grupie J<sub>1</sub>** najniższą wartość ( $0,37 \pm 0,17$  ng/ml) w 52 godzinie, a w **grupie J<sub>2</sub>** ( $0,31 \pm 0,04$  ng/ml) w 56 godzinie od wyciągnięcia gąbek. W **grupie J<sub>1</sub>** w ostatnich godzinach stężenie P<sub>4</sub> było podobne do wyjściowego ( $0,49 \pm 0,27$  ng/ml), natomiast w **grupie J<sub>2</sub>** wynosiło  $0,38 \pm 0,11$  ng/ml.

W okresie wiosennym poziom progesteronu w momencie wyciągnięcia gąbek wynosił w **grupie W<sub>1</sub>** –  $0,22 \pm 0,08$  ng/ml, a w **grupie W<sub>2</sub>** –  $0,28 \pm 0,08$  ng/ml. W kolejnych godzinach średnie stężenie w **grupie W<sub>1</sub>** nieznacznie wzrosło osiągając w 68 godzinie poziom  $0,35 \pm 0,18$  ng/ml. W **grupie W<sub>2</sub>** stężenie progesteronu w ostatniej godzinie wynosiło  $0,28 \pm 0,06$  ng/ml.



Ryc. 1. Profil progesteronu podczas synchronizowanej rui w okresie jesiennym



Ryc. 2. Profil progesteronu podczas stymulowanej rui w okresie wiosennym

Zestawienie średnich stężeń ze wszystkich próbek w poszczególnych latach i sezonach przedstawiono w tabeli 2. Pomędzy wszystkimi grupami stwierdzono statystycznie wysoko istotne różnice stężeń progesteronu, przy czym w sezonach jesiennych w obydwu badanych latach poziom  $P_4$  był zawsze wyższy niż w okresach wiosennych. W pierwszym roku badań, stężenie hormonu okazało się wyższe w porównaniu do drugiego roku badań.

Tab. 2. Stężenie progesteronu [ng/ml] w badanych latach i sezonach

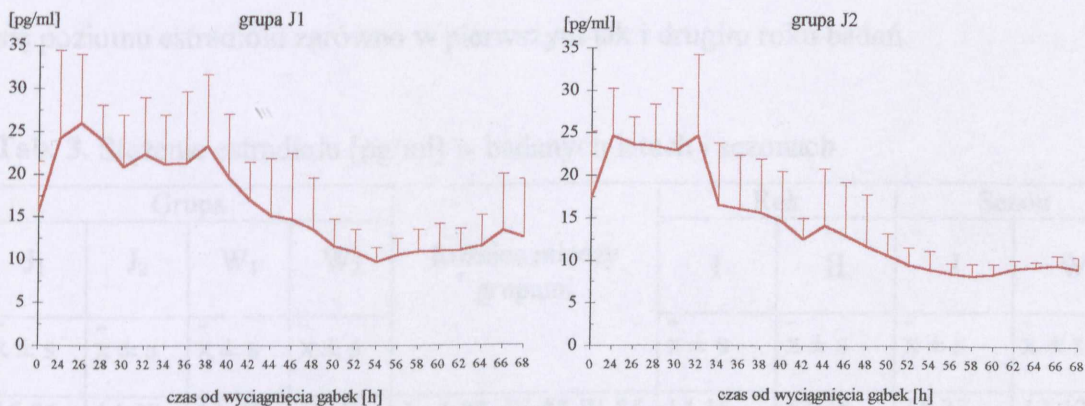
Grupa				Różnice między grupami	Rok		Sezon	
J <sub>1</sub>	J <sub>2</sub>	W <sub>1</sub>	W <sub>2</sub>		I	II	J	W
$\bar{x} \pm s$	$\bar{x} \pm s$	$\bar{x} \pm s$	$\bar{x} \pm s$		$\bar{x} \pm s$	$\bar{x} \pm s$	$\bar{x} \pm s$	$\bar{x} \pm s$
0,46 ±0,24	0,35 ±0,09	0,30 ±0,16	0,23 ±0,07	J <sub>1</sub> - J <sub>2</sub> ** J <sub>2</sub> - W <sub>1</sub> ** W <sub>1</sub> -W <sub>2</sub> **	0,38 ±0,22	0,29 ±0,09**	0,41 ±0,19	0,27 ±0,13**

n - liczba prób = 144 (w grupie)

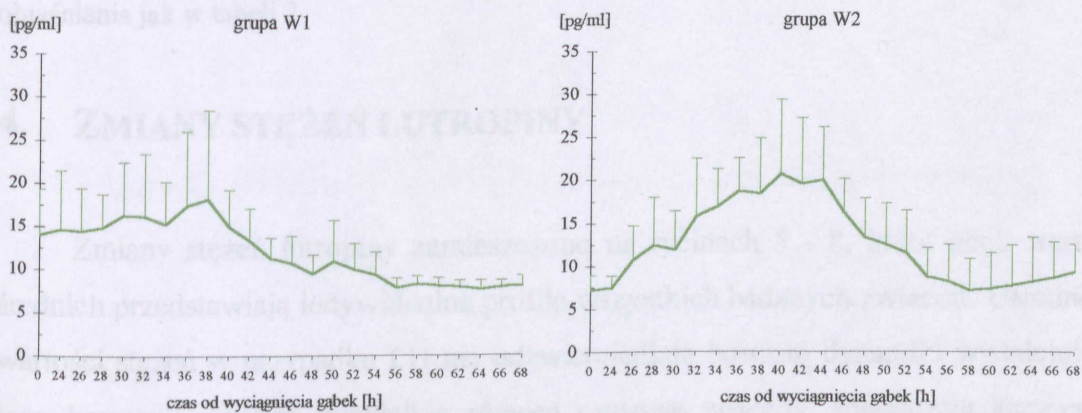
\*, \*\* - istotność różnic między grupami, odpowiednio przy  $P \leq 0,05$ ,  $P \leq 0,01$ .

### 3. ZMIANY STĘŻEŃ ESTRADIOLU

Dynamikę zmian stężeń estradiolu obrazują ryciny 3 - 4. W okresie jesiennym w grupie **J<sub>1</sub>** i **J<sub>2</sub>** wyjściowe stężenie wynosiło odpowiednio  $15,65 \pm 5,83 \text{ pg/ml}$  i  $17,37 \pm 7,81 \text{ pg/ml}$ . W kolejnych godzinach poziom  $E_2$  wzrósł, a średnia wartość maksymalnych stężeń wynosiła  $31,13 \pm 5,3 \text{ pg/ml}$  w grupie **J<sub>1</sub>** (24-28h) i  $29,3 \pm 6,61 \text{ pg/ml}$  w grupie **J<sub>2</sub>** (24-32h). Podwyższony poziom utrzymywał się do 38 godziny w grupie **J<sub>1</sub>** i do 32 godziny w grupie **J<sub>2</sub>**. Po tym czasie stężenie estradiolu w obydwu grupach zaczęło się zmniejszać. Najniższy poziom wynoszący w grupie **J<sub>1</sub>**  $9,8 \pm 1,64 \text{ pg/ml}$  i w grupie **J<sub>2</sub>**  $8,2 \pm 1,44 \text{ pg/ml}$  zanotowano odpowiednio w 54 i 58 godzinie od momentu wyciągnięcia gąbek.



Ryc. 3. Profil estradiolu podczas synchronizowanej rui w okresie jesiennym



Ryc. 4. Profil estradiolu podczas stymulowanej rui w okresie wiosennym

W okresie wiosennym w grupie  $W_1$  i  $W_2$  wyjściowe stężenie estradiolu wynosiło odpowiednio  $14,07 \pm 5,23$  pg/ml i  $7,18 \pm 1,70$  pg/ml. Najwyższe poziomy w grupie  $W_1$  ( $20,85 \pm 10,21$  pg/ml) zanotowano między 24 a 38 godziną, a w grupie  $W_2$  ( $25,00 \pm 7,60$  pg/ml) między 30 a 44 godziną od wyciągnięcia gąbek. W kolejnych godzinach stężenie estradiolu zaczęło się zmniejszać. W grupie  $W_1$  najniższy poziom ( $7,63 \pm 1,01$  pg/ml) zanotowano w 56 godzinie, a w grupie  $W_2$  ( $7,20 \pm 3,72$  pg/ml) w 58 godzinie od wyciągnięcia gąbek.

W tabeli 3 zestawiono średnie wartości stężeń estradiolu ze wszystkich pobrań w poszczególnych latach i sezonach. W pierwszym i drugim roku badań w okresie jesiennym średnie stężenie  $E_2$  było istotnie większe niż w obydwu grupach wiosennych. Pomiędzy grupą  $W_1$  a  $W_2$  nie wykazano istotnych różnic, jednakże stwierdzono różnice pomiędzy grupami jesiennymi. W pierwszym roku badań w grupie  $J_1$  średnie stężenie estradiolu było istotnie wyższe niż w grupie  $J_2$ .

Wykazano, że sezon ma wysoko istotny statystycznie ( $P \leq 0,01$ ) wpływ na kształtowanie się poziomu estradiolu zarówno w pierwszym jak i drugim roku badań.

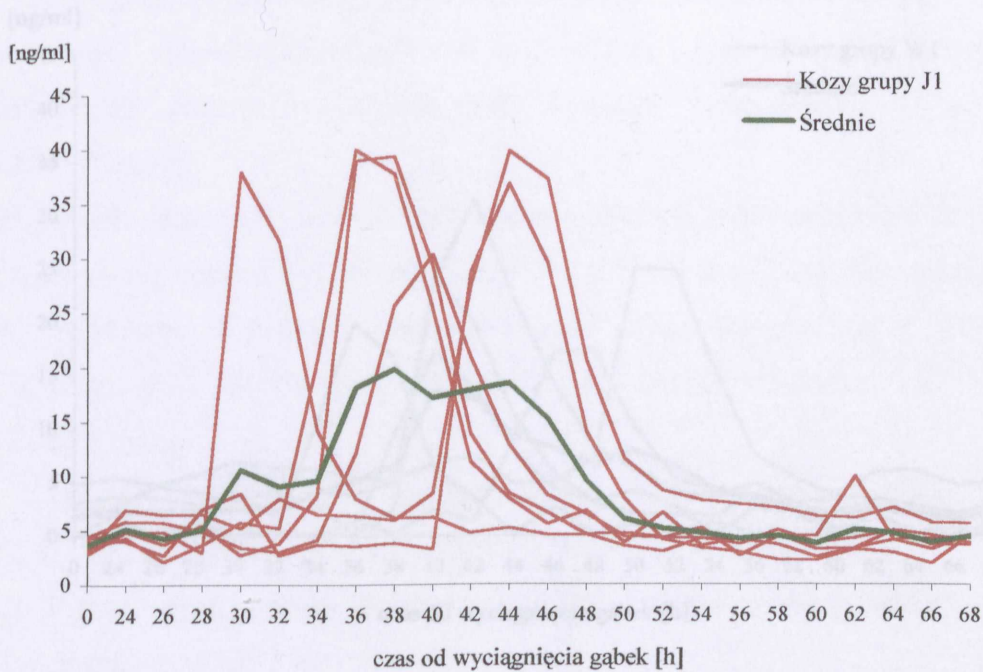
**Tab. 3.** Stężenie estradiolu [pg/ml] w badanych latach i sezonach

Grupa				Różnice między grupami	Rok		Sezon	
$J_1$	$J_2$	$W_1$	$W_2$		I	II	J	W
$\bar{x} \pm s$	$\bar{x} \pm s$	$\bar{x} \pm s$	$\bar{x} \pm s$		$\bar{x} \pm s$	$\bar{x} \pm s$	$\bar{x} \pm s$	$\bar{x} \pm s$
16,36 $\pm 7,52$	14,29 $\pm 7,26$	11,96 $\pm 5,73$	12,49 $\pm 6,47$	$J_1 - J_2^{**}, W_1^{**} W_2^{**}$ $J_2 - W_1^{**}, W_2^*$	14,16 $\pm 7,02$	13,38 $\pm 6,92$	15,33 $\pm 7,45$	12,22 $\pm 6,10^{**}$

objaśnienia jak w tabeli 2

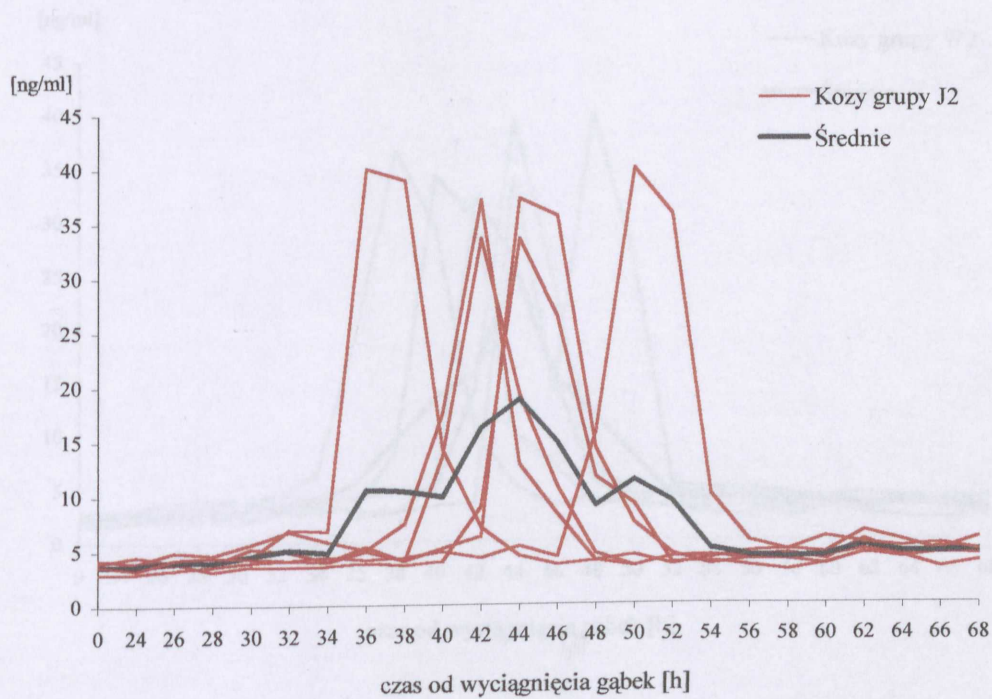
#### 4. ZMIANY STĘŻEŃ LUTROPINY

Zmiany stężeń lutropiny zamieszczono na rycinach 5 - 8, które obok wartości średnich przedstawiają indywidualne profile wszystkich badanych zwierząt. Uśrednione wartości stężeń w przypadku LH nie odzwierciedlają bowiem dynamiki wydzielniczej tego hormonu i nawet niewielkie różnice czasowe znacznie spłaszczają krzywą na wykresie, co odnosi się w szczególności do „piku” LH.



Ryc. 7. Profil lutropiny podczas synchronizowanej rui w pierwszym okresie wiosennym

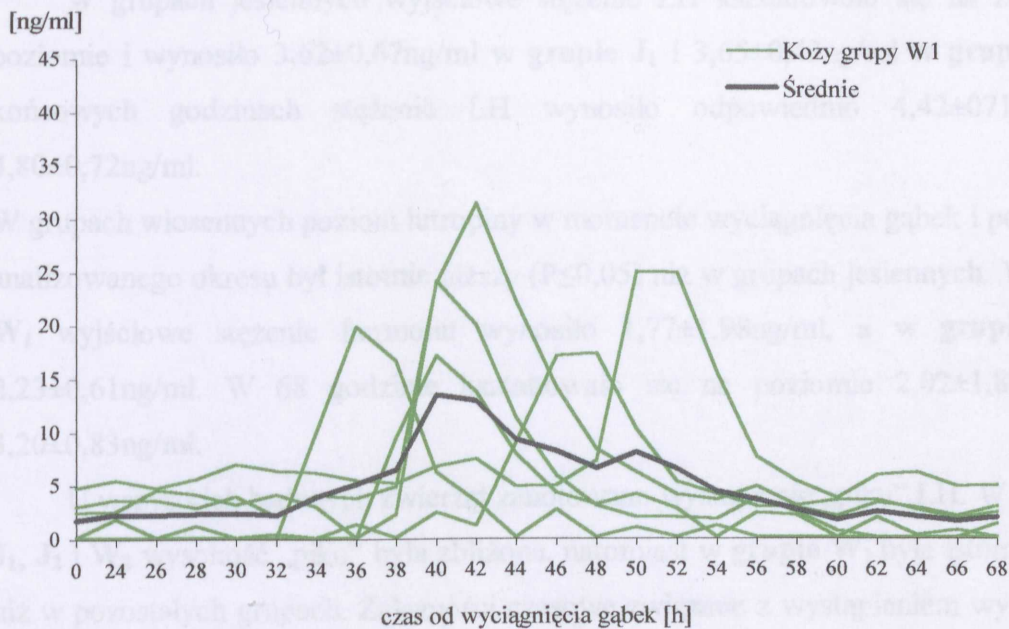
Ryc. 5. Profil lutropiny podczas synchronizowanej rui w pierwszym okresie jesiennym



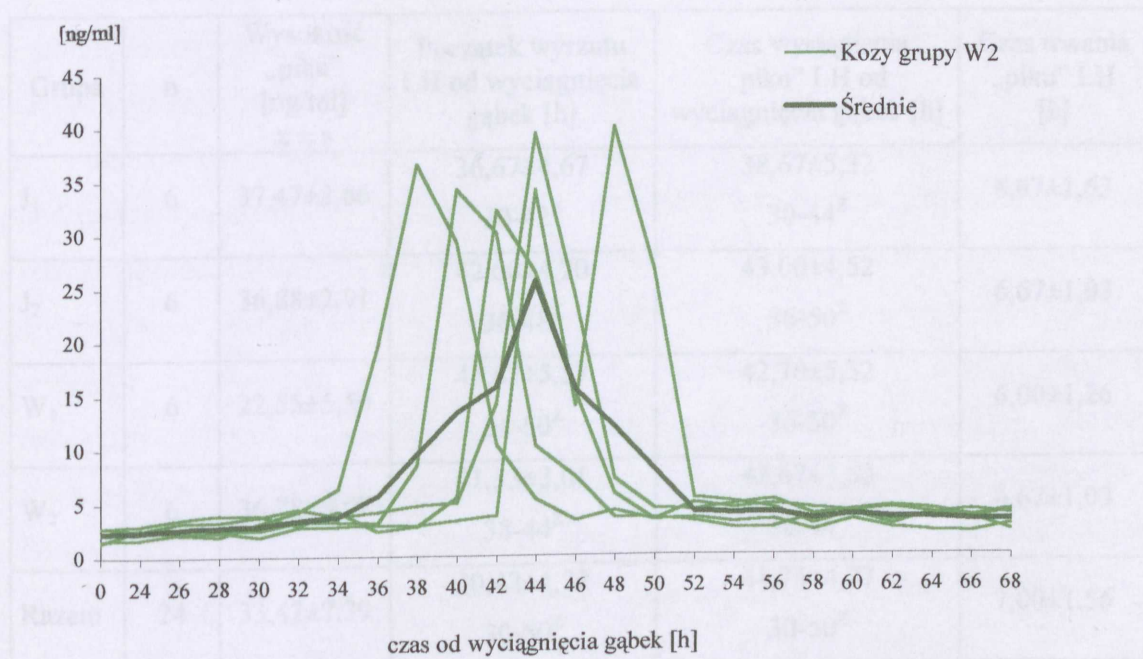
Ryc. 8. Profil lutropiny podczas synchronizowanej rui w drugim okresie wiosennym

Ryc. 6. Profil lutropiny podczas synchronizowanej rui w drugim okresie jesiennym





Ryc. 7. Profil lutropiny podczas stymulowanej rui w pierwszym okresie wiosennym



Ryc. 8. Profil lutropiny podczas stymulowanej rui w drugim okresie wiosennym

W grupach jesiennych wyjściowe stężenie LH kształtowało się na zbliżonym poziomie i wynosiło  $3,62 \pm 0,67 \text{ ng/ml}$  w grupie **J<sub>1</sub>** i  $3,65 \pm 0,43 \text{ ng/ml}$  w grupie **J<sub>2</sub>**. W końcowych godzinach stężenie LH wynosiło odpowiednio  $4,42 \pm 0,71 \text{ ng/ml}$  i  $4,80 \pm 0,72 \text{ ng/ml}$ .

W grupach wiosennych poziom lutropiny w momencie wyciągnięcia gąbek i pod koniec analizowanego okresu był istotnie niższy ( $P \leq 0,05$ ) niż w grupach jesiennych. W grupie **W<sub>1</sub>** wyjściowe stężenie hormonu wynosiło  $1,77 \pm 1,98 \text{ ng/ml}$ , a w grupie **W<sub>2</sub>** -  $2,23 \pm 0,61 \text{ ng/ml}$ . W 68 godzinie kształtowało się na poziomie  $2,02 \pm 1,89 \text{ ng/ml}$  i  $3,20 \pm 0,83 \text{ ng/ml}$ .

U wszystkich badanych zwierząt zanotowano wystąpienie „piku” LH. W grupach **J<sub>1</sub>**, **J<sub>2</sub>** i **W<sub>2</sub>** wysokość „piku” była zbliżona, natomiast w grupie **W<sub>2</sub>** była istotnie niższa niż w pozostałych grupach. Zależności czasowe związane z wystąpieniem wyrzutu LH przedstawiono w tabeli 4.

#### 5. ZMIANY STĘŻENIA PROLAKTYNY

**Tab. 4.** Wysokość „piku” LH i zależności czasowe związane z jego wystąpieniem w poszczególnych grupach

Grupa	n	Wysokość „piku” [ng/ml] $\bar{x} \pm s$	Początek wyrzutu LH od wyciągnięcia gąbek [h]	Czas wystąpienia „piku” LH od wyciągnięcia gąbek [h]	Czas trwania „piku” LH [h]
J <sub>1</sub>	6	$37,47 \pm 3,66$	$36,67 \pm 4,67$ 30-42 <sup>Z</sup>	$38,67 \pm 5,32$ 30-44 <sup>Z</sup>	$8,67 \pm 1,63$
J <sub>2</sub>	6	$36,88 \pm 2,91$	$42,00 \pm 4,20$ 36-48 <sup>Z</sup>	$43,00 \pm 4,52$ 36-50 <sup>Z</sup>	$6,67 \pm 1,03$
W <sub>1</sub>	6	$22,55 \pm 5,50$	$41,67 \pm 5,57$ 34-50 <sup>Z</sup>	$42,70 \pm 5,32$ 36-50 <sup>Z</sup>	$6,00 \pm 1,26$
W <sub>2</sub>	6	$36,78 \pm 3,07$	$41,33 \pm 3,01$ 38-44 <sup>Z</sup>	$42,67 \pm 3,50$ 38-44 <sup>Z</sup>	$6,67 \pm 1,03$
Razem	24	$33,42 \pm 7,39$	$40,42 \pm 4,72$ 30-50 <sup>Z</sup>	$41,75 \pm 4,77$ 30-50 <sup>Z</sup>	$7,00 \pm 1,56$

n - liczba zwierząt

<sup>Z</sup> - zakres czasowy

W tabeli 5 zestawiono średnie stężenia ze wszystkich pobrań w poszczególnych latach i sezonach. Najmniejsze stężenie zanotowano w grupie **W<sub>1</sub>** i wykazano, że było ono istotnie niższe ( $P \leq 0,01$ ) niż w obydwu grupach jesiennych oraz w drugiej grupie

wiosennej. Nie stwierdzono natomiast statystycznie istotnych różnic pomiędzy grupami jesiennymi. W analizie łącznej wykazano natomiast, że wpływ roku na badaną cechę okazał się nieistotny a sezon wysoko istotny.

**Tab. 5.** Stężenie lutropiny [ng/ml] w badanych latach i sezonach

Grupa				Różnice między grupami	Rok		Sezon	
J <sub>1</sub>	J <sub>2</sub>	W <sub>1</sub>	W <sub>2</sub>		I	II	J	W
$\bar{x} \pm s$	$\bar{x} \pm s$	$\bar{x} \pm s$	$\bar{x} \pm s$		$\bar{x} \pm s$	$\bar{x} \pm s$	$\bar{x} \pm s$	$\bar{x} \pm s$
8,74 ±9,54	7,36 ±8,32	4,78 ±6,07	6,53 ±8,67	J <sub>1</sub> - W <sub>1</sub> ** W <sub>2</sub> * J <sub>2</sub> - W <sub>1</sub> * W <sub>1</sub> - W <sub>2</sub> *	6,76 ±8,22	6,94 ±8,49	8,05 ±8,66	5,66 ±7,53**

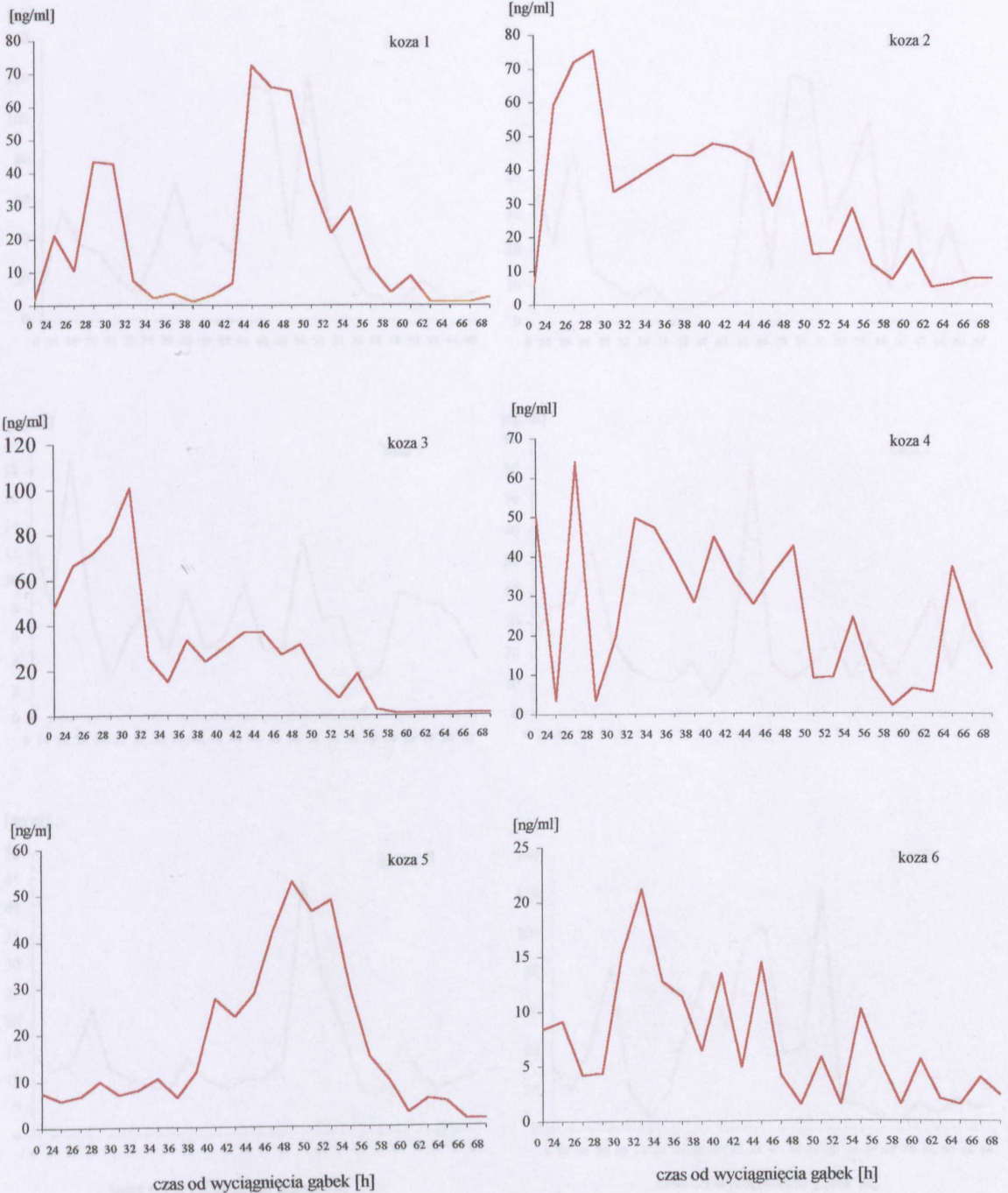
objaśnienia jak w tabeli 2

## 5. ZMIANY STĘŻEŃ PROLAKTYNY

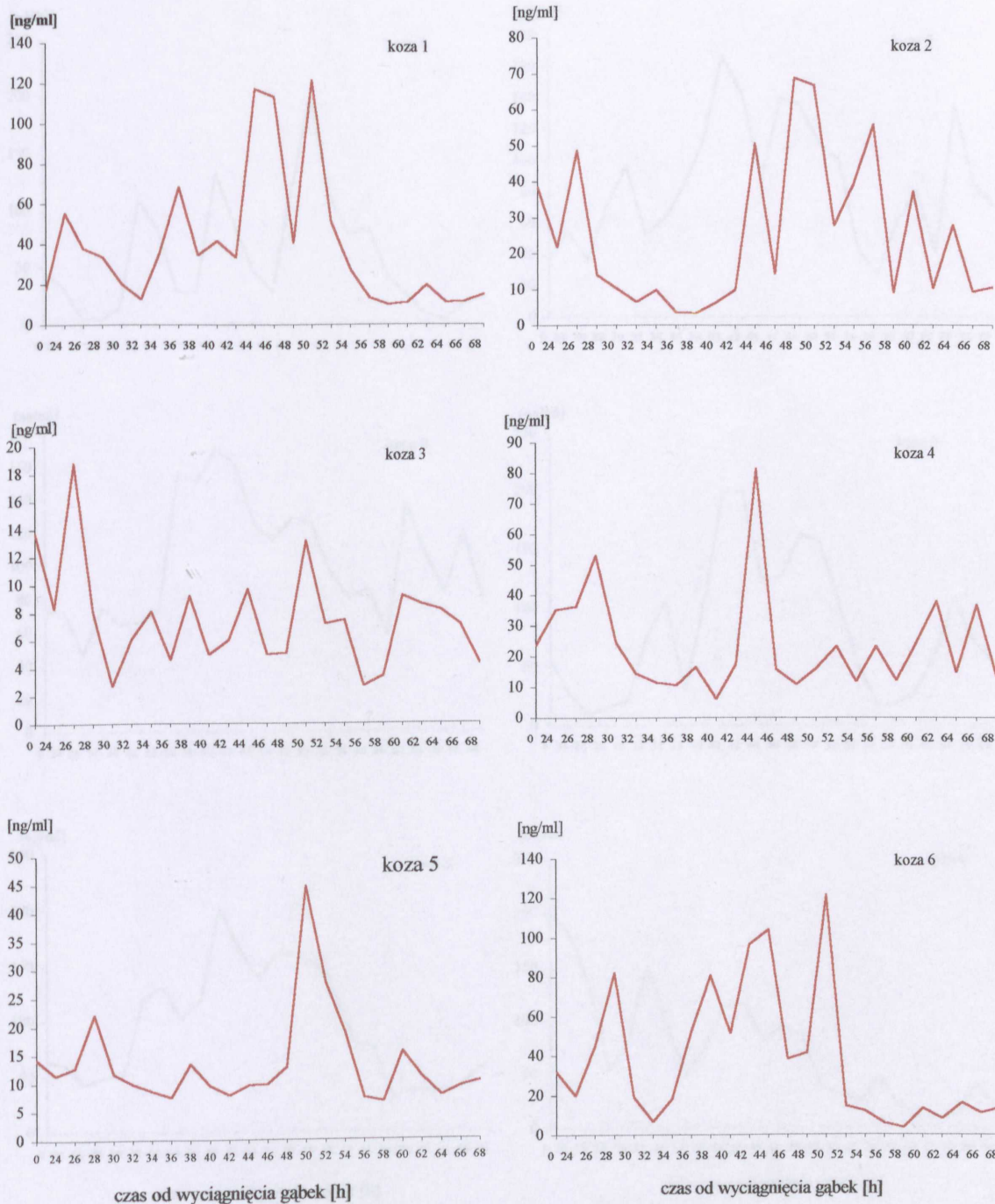
Duże różnice indywidualne w poziomach prolaktyny nie pozwalają na analizę uśrednionych profili, dlatego też na rycinach 9 – 12 przedstawiono dynamikę zmian stężeń tego hormonu u poszczególnych zwierząt.

Ryciny 9 i 10 obrazują kształtowanie się poziomu prolaktyny w grupach zwierząt poddanych synchronizacji rui jesienią. U wszystkich kóz w tym okresie stwierdzono wzrost stężenia PRL, który u większości zwierząt był kilkakrotnie wyższy od poziomu wyjściowego. Średnie wartości najwyższej amplitudy hormonu w **grupie J<sub>1</sub>** i **J<sub>2</sub>** wynosiły odpowiednio 64,4±26,43ng/ml i 76,2±41,27ng/ml. Czas wystąpienia najwyższych poziomów prolaktyny u poszczególnych kóz był zróżnicowany, niemniej u wszystkich zwierząt szczyt uwalniania hormonu zanotowano w okresie między 24 a 50 godziną od wyciągnięcia gąbek. Po tym czasie stężenie prolaktyny znacznie się obniżyło osiągając w 68 godzinie średnią wartość 4,40±4,19ng/ml w **grupie J<sub>1</sub>** i 11,18±3,84ng/ml w **grupie J<sub>2</sub>**.

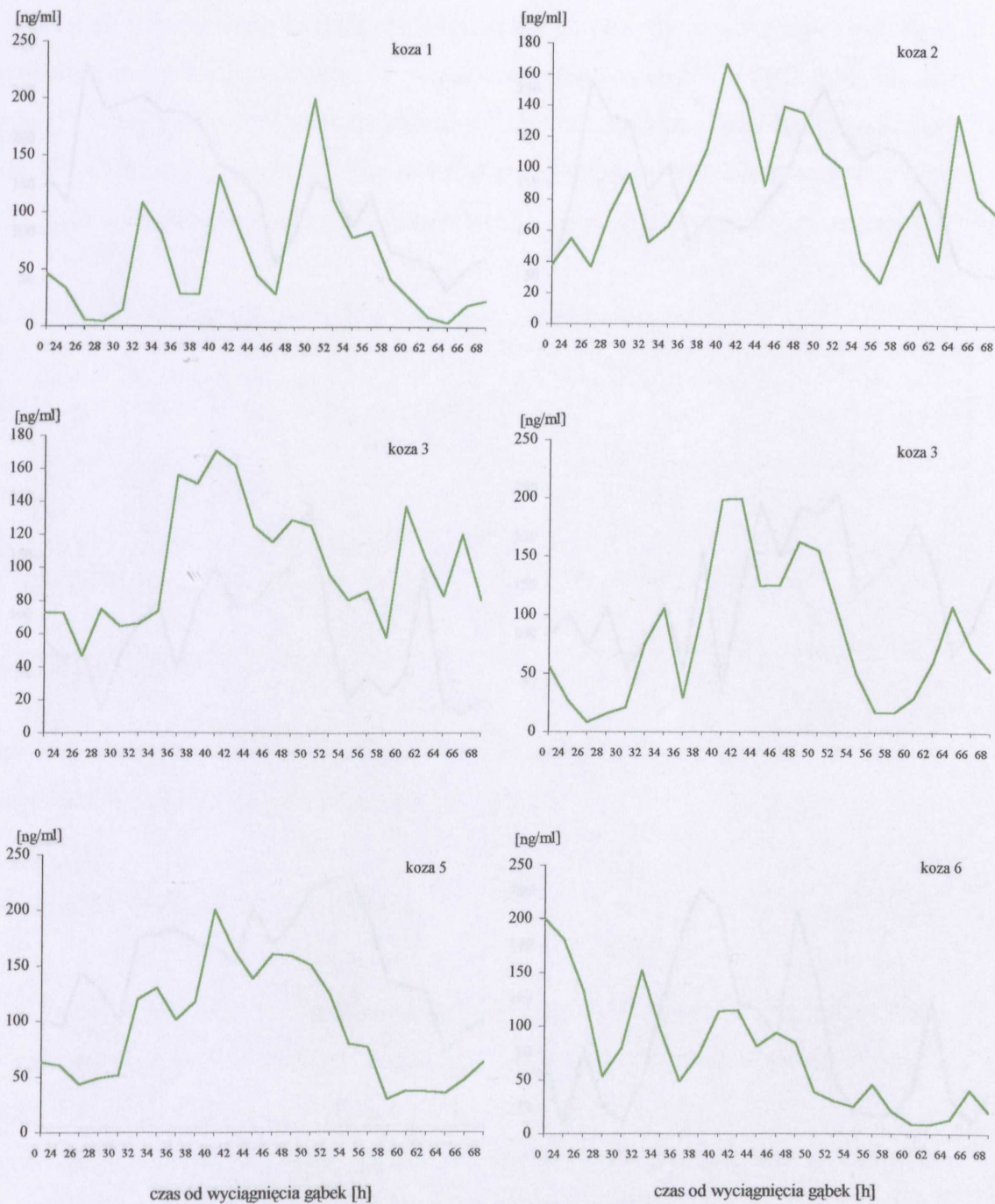
Na rycinach 11 i 12 zamieszczono profile uwalniania prolaktyny u kóz obu grup wiosennych. U większości zwierząt zaobserwowano wzrost stężenia prolaktyny, które było znacznie wyższe od poziomu wyjściowego. Tylko u jednej kozy (**grupa W<sub>1</sub>**) najwyższy poziom zanotowano już w czasie wyciągnięcia gąbek, a u pozostałych zwierząt szczyt wydzielania prolaktyny wystąpił w okresie między 26 a 54 godziną.



Ryc. 9. Profil prolaktyny podczas synchronizowanej rui w pierwszym okresie jesiennym

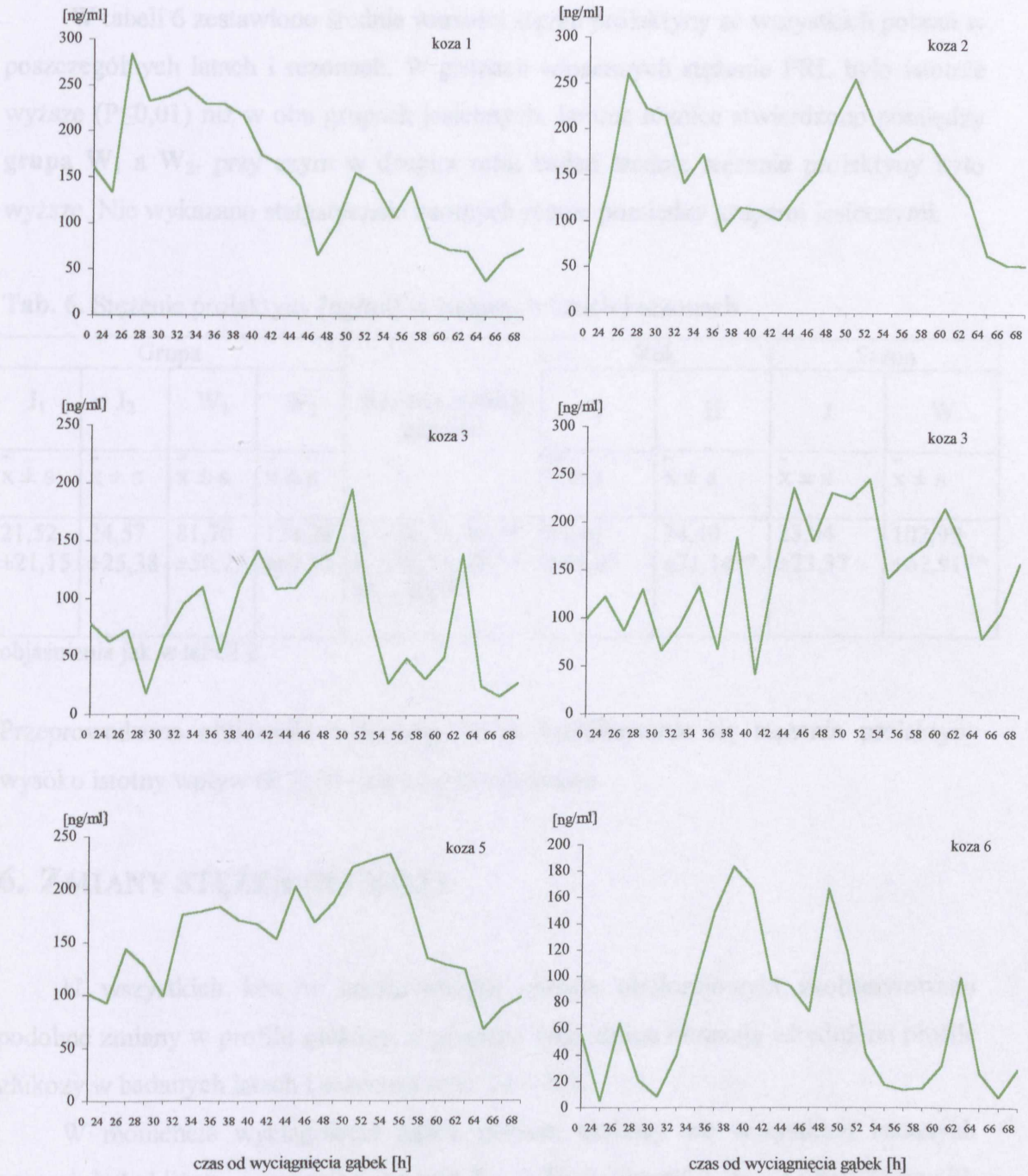


Ryc. 10. Profil prolaktyny podczas synchronizowanej rui w drugim okresie jesiennym



Ryc. 11. Profil prolaktyny podczas stymulowanej rui w pierwszym okresie wiosennym

Srednia amplituda szczytu PRL w grupie W<sub>1</sub> i W<sub>2</sub> wyniosła odpowiednio 189,17±16,00ng/ml i 233,00±78,22ng/ml. W obu grupach widoczne są zmiany w kształcie profilu PRL w czasie stymulacji, w grupie W<sub>1</sub> i 73,25±49,39ng/ml w grupie W<sub>2</sub>.



Ryc. 12. Profil prolaktyny podczas stymulowanej rui w drugim okresie wiosennym

Średnia amplituda szczytu PRL w grupie  $W_1$  i  $W_2$  wynosiła odpowiednio  $189,17 \pm 16,00 \text{ ng/ml}$  i  $233,00 \pm 38,38 \text{ ng/ml}$ . W 68 godzinie średnie stężenie prolaktyny kształtowało się na poziomie  $51,80 \pm 25,14 \text{ ng/ml}$  w grupie  $W_1$  i  $73,25 \pm 49,59 \text{ ng/ml}$  w grupie  $W_2$ .

W tabeli 6 zestawiono średnie wartości stężeń prolaktyny ze wszystkich pobrań w poszczególnych latach i sezonach. W grupach wiosennych stężenie PRL było istotnie wyższe ( $P \leq 0,01$ ) niż w obu grupach jesiennych. Istotne różnice stwierdzono pomiędzy grupą  $W_1$  a  $W_2$ , przy czym w drugim roku badań średnie stężenie prolaktyny było wyższe. Nie wykazano statystycznie istotnych różnic pomiędzy grupami jesiennymi.

**Tab. 6.** Stężenie prolaktyny [ng/ml] w badanych latach i sezonach

Grupa				Różnice między grupami	Rok		Sezon	
$J_1$	$J_2$	$W_1$	$W_2$		I	II	J	W
$\bar{x} \pm s$	$\bar{x} \pm s$	$\bar{x} \pm s$	$\bar{x} \pm s$		$\bar{x} \pm s$	$\bar{x} \pm s$	$\bar{x} \pm s$	$\bar{x} \pm s$
21,52 $\pm 21,15$	24,57 $\pm 25,38$	81,70 $\pm 50,23$	124,28 $\pm 67,13$	$J_1 - W_1^{**}, W_2^{**}$ $J_2 - W_1^{**}, W_2^{**}$ $W_1 - W_2^{**}$	51,61 $\pm 48,87$	74,40 $\pm 71,14^{**}$	23,04 $\pm 23,37$	102,99 $\pm 62,91^{**}$

objaśnienia jak w tabeli 2

Przeprowadzone obliczenia wykazały, że na kształtowanie się stężenia prolaktyny wysoko istotny wpływ ( $P \leq 0,01$ ) ma sezon i rok badań.

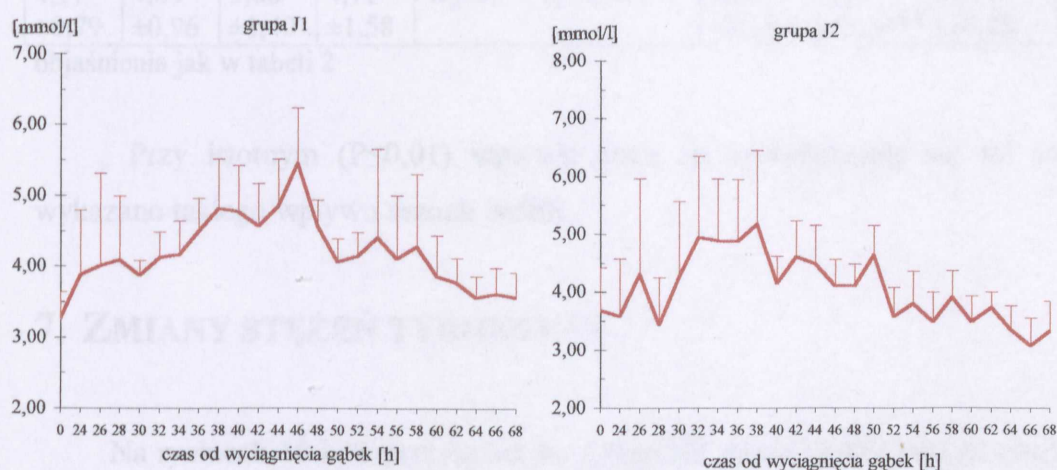
## 6. ZMIANY STĘŻEŃ GLUKOZY

U wszystkich kóz w analizowanym okresie okołorujowym zaobserwowano podobne zmiany w profilu glukozy, a przebieg tych zmian obrazują uśrednione profile glukozy w badanych latach i sezonach (ryc. 13 – 14).

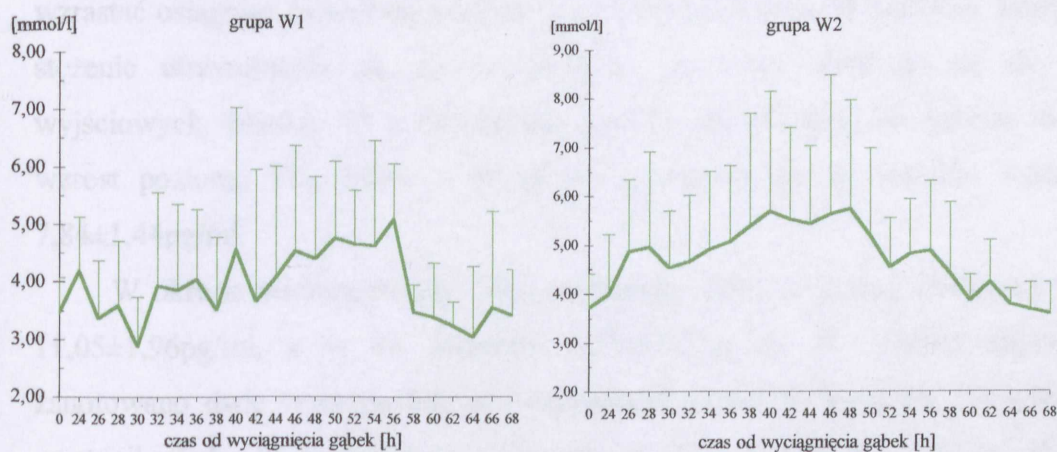
W momencie wyciągnięcia gąbek poziom glukozy we wszystkich badanych grupach był zbliżony i wynosił w grupie  $J_1$  -  $3,27 \pm 0,37 \text{ mmol/l}$ ,  $J_2$  -  $3,68 \pm 0,74 \text{ mmol/l}$ ,  $W_1$  -  $3,47 \pm 0,60 \text{ mmol/l}$  i  $W_2$  -  $3,71 \pm 0,7 \text{ mmol/l}$ . W kolejnych godzinach stężenie glukozy zaczęło stopniowo wzrastać osiągając najwyższy poziom  $5,45 \pm 0,79 \text{ mmol/l}$  w grupie  $J_1$  i  $5,18 \pm 1,28 \text{ mmol/l}$  w grupie  $J_2$ . W okresie wiosennym najwyższy poziom wynosił średnio  $5,10 \pm 0,97 \text{ mmol/l}$  w grupie  $W_1$  i  $5,69 \pm 2,24 \text{ mmol}$  w grupie  $W_2$ . W grupach



jesiennych najwyższy poziom zanotowano o kilka godzin wcześniej niż w grupach wiosennych. U wszystkich zwierząt pod koniec analizowanego okresu stężenie glukozy obniżyło się osiągając poziom zbliżony do wyjściowego.



Ryc. 13. Profil glukozy podczas synchronizowanej rui w okresie jesiennym



Ryc. 14. Profil glukozy podczas stymulowanej rui w okresie wiosennym

Zestawienie średnich stężeń glukozy ze wszystkich próbek w poszczególnych latach i sezonach przedstawiono w tabeli 7. Najwyższy poziom glukozy zanotowano w grupie W<sub>2</sub> i był on istotnie wyższy od stężenia tego parametru w pozostałych grupach. Pomiędzy grupą J<sub>1</sub>, J<sub>2</sub> i W<sub>1</sub> nie stwierdzono statystycznie istotnych różnic.

Tab. 7. Stężenie glukozy [mmol/l] w badanych latach i sezonach

Grupa				Różnice między grupami	Rok		Sezon	
J <sub>1</sub>	J <sub>2</sub>	W <sub>1</sub>	W <sub>2</sub>		I	II	J	W
$\bar{x} \pm s$	$\bar{x} \pm s$	$\bar{x} \pm s$	$\bar{x} \pm s$		$\bar{x} \pm s$	$\bar{x} \pm s$	$\bar{x} \pm s$	$\bar{x} \pm s$
4,17 ±0,79	4,04 ±0,96	3,88 ±1,40	4,71 ±1,58	W <sub>2</sub> - J <sub>1</sub> ** J <sub>2</sub> ** W <sub>1</sub> **	4,02 ±1,15	4,37 ±1,34**	4,11 ±0,88	4,29 ±1,55

objaśnienia jak w tabeli 2

Przy istotnym ( $P \leq 0,01$ ) wpływie roku na kształtowanie się tej cechy, nie wykazano takiego wpływu sezonu badań.

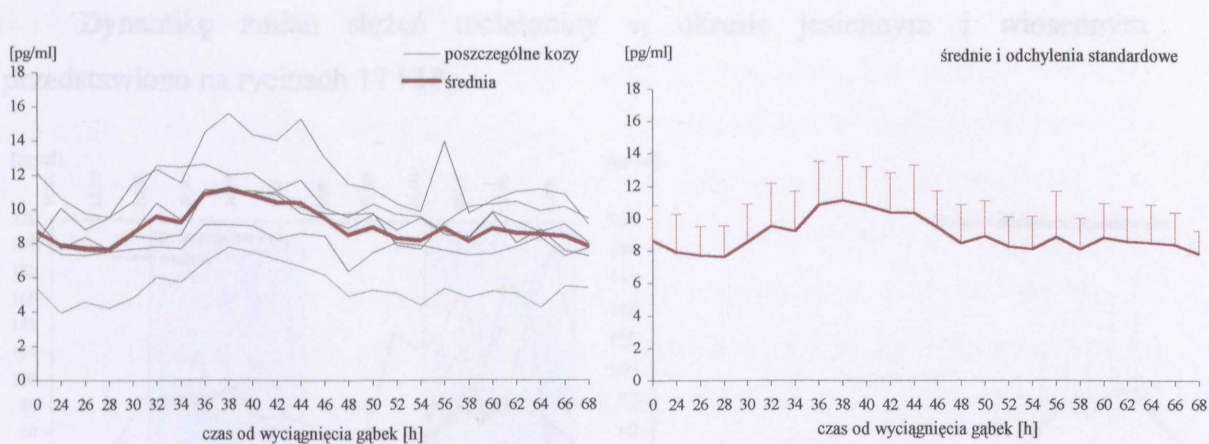
## 7. ZMIANY STĘŻEŃ TYROKSYNY

Na rycinach 15 i 16 przedstawiono dynamikę zmian stężeń wolnej tyroksyny. W okresie jesiennym (**gr. J<sub>2</sub>**) stężenie wyjściowe wynosiło  $8,66 \pm 2,17$  pg/ml i na zbliżonym poziomie utrzymywało się do 30 godziny. Po tym czasie stężenie hormonu zaczęło wzrastać osiągając najwyższy poziom ( $11,15 \pm 2,68$  pg/ml) w 38 godzinie. Podwyższone stężenie utrzymywało się do 46 godziny, po czym obniżyło się do wartości wyjściowych. Między 54 a 66 godziną zanotowano kolejny, ale bardzo nieznaczny wzrost poziomu FT<sub>4</sub>, który w 68 godzinie obniżył się do wartości wynoszących  $7,84 \pm 1,44$  pg/ml.

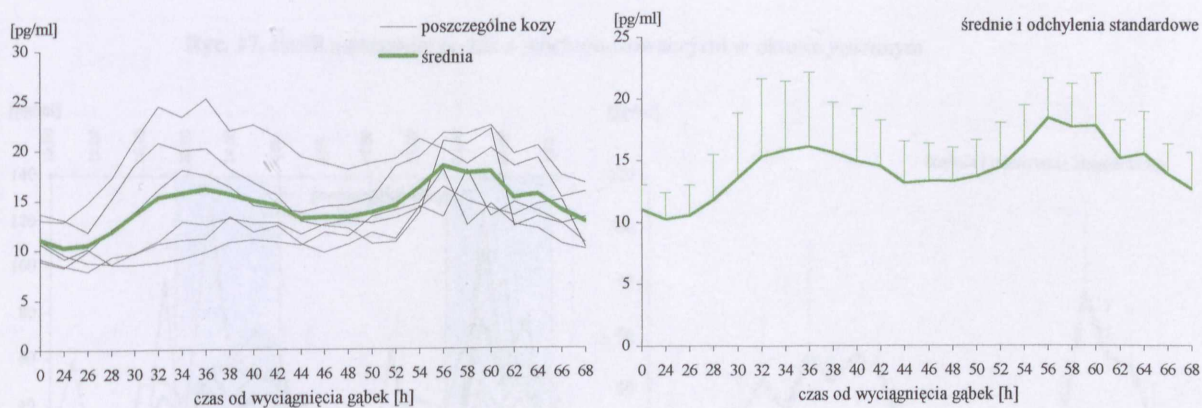
W okresie wiosennym (**gr. W<sub>2</sub>**) wyjściowe stężenie wolnej tyroksyny wynosiło  $11,05 \pm 1,96$  pg/ml, a w 68 godzinie  $12,72 \pm 2,97$  pg/ml. W analizowanym okresie zanotowano dwie wyraźne fale podwyższonego poziomu hormonu. Pierwszy wzrost wystąpił między 26 a 44 godziną, osiągając szczyt w 36 godzinie ( $16,12 \pm 5,99$  pg/ml), a drugi między 50 a 68 godziną z najwyższym poziomem w 56 godzinie ( $18,53 \pm 3,19$  pg/ml).

W tabeli 8 zestawiono średnie stężenia ze wszystkich próbek pobranych w okresie jesiennym i wiosennym w drugim roku badań. Wykazano statystycznie istotne różnice międzysezonowe. W okresie wiosennym stężenie wolnej tyroksyny było wysoko istotnie wyższe ( $P \leq 0,01$ ) niż w okresie jesiennym.

## 3. ZMIANY STĘŻEŃ MELATONINY



Ryc. 15. Profil tyroksyny podczas synchronizowanej rui w okresie jesiennym



Ryc. 16. Profil wolnej tyroksyny podczas stymulowanej rui w okresie wiosennym

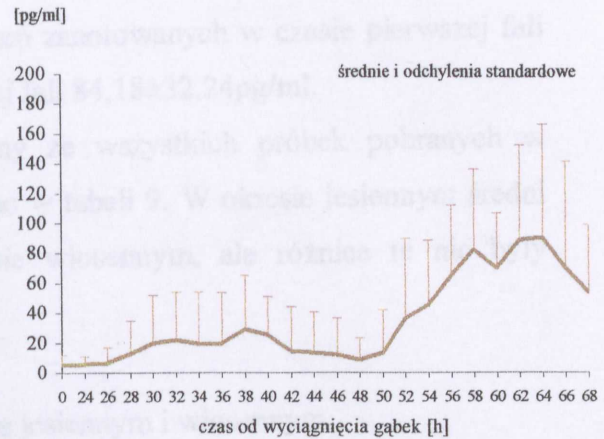
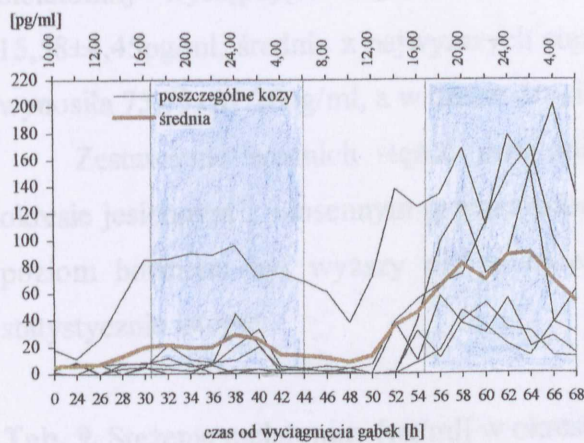
Tab. 8. Stężenie tyroksyny [pg/ml] w okresie jesiennym i wiosennym

Grupa	Rok	Sezon	n	$\bar{x} \pm s$
J <sub>2</sub>	II	Jesień	144	8,97 ± 2,34**
W <sub>2</sub>	II	Wiosna	144	14,40 ± 4,10

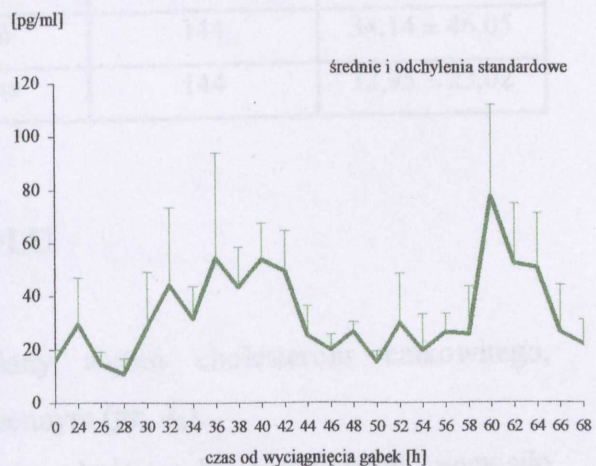
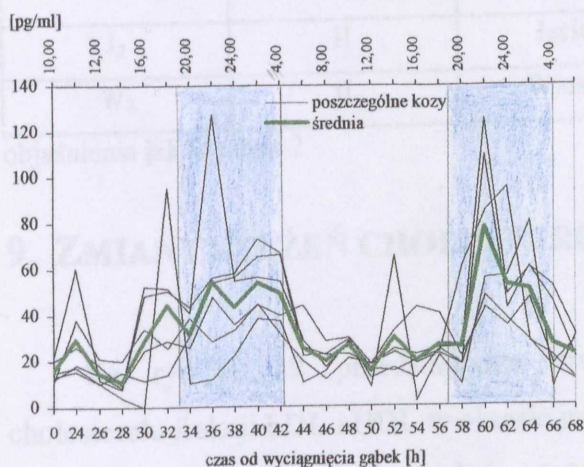
objaśnienia jak w tabeli 2

## 8. ZMIANY STĘŻEŃ MELATONINY

Dynamikę zmian stężeń melatoniny w okresie jesiennym i wiosennym przedstawiono na rycinach 17 i 18.



Ryc. 17. Profil melatoniny podczas synchronizowanej rui w okresie jesiennym



Ryc. 18. Profil melatoniny podczas stymulowanej rui w okresie wiosennym

W grupie  $J_2$  w analizowanym przedziale czasowym zaobserwowano dwie fale podwyższonego poziomu hormonu przypadające na godziny nocne, przy czym w czasie pierwszej nocy wzrost ten był znacznie niższy, niż w czasie drugiej nocy. Stężenie wyjściowe wynosiło  $5,03 \pm 6,47$  pg/ml, średnie wartości maksymalnych poziomów w czasie pierwszej fali  $37,81 \pm 31,04$  pg/ml, a w czasie drugiej fali  $113,65 \pm 69,19$  pg/ml.

Stwierdzone wysokie wartości odchyłeń standardowych wynikają z różnic stężeń hormonu, natomiast tendencja kształtowania się profilu uwalniania melatoniny u poszczególnych zwierząt była zbliżona.

W okresie wiosennym (**gr. W<sub>2</sub>**) zanotowano również dwie fale wzrostu stężenia melatoniny występujące zbieżnie z fazą ciemności. Poziom wyjściowy wynosił  $15,58 \pm 4,45$  pg/ml, średnia z najwyższych stężeń zanotowanych w czasie pierwszej fali wynosiła  $75,75 \pm 31,26$  pg/ml, a w czasie drugiej fali  $84,18 \pm 32,24$  pg/ml.

Zestawienie średnich stężeń melatoniny ze wszystkich próbek pobranych w okresie jesiennym i wiosennym przedstawiono w tabeli 9. W okresie jesiennym średni poziom hormonu był wyższy niż w okresie wiosennym, ale różnice te nie były statystycznie istotne.

**Tab. 9.** Stężenie melatoniny [pg/ml] w okresie jesiennym i wiosennym

Grupa	Rok	Sezon	n	$\bar{x} \pm s$
J <sub>2</sub>	II	Jesień	144	$34,14 \pm 46,05$
W <sub>2</sub>	II	Wiosna	144	$32,95 \pm 23,02$

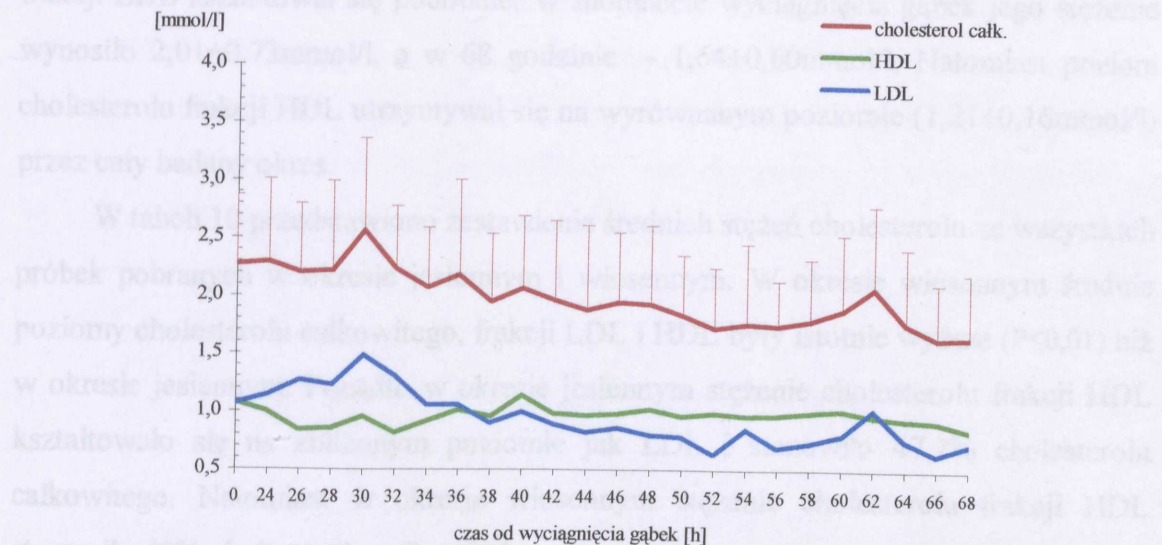
objaśnienia jak w tabeli 2

## 9. ZMIANY STĘŻEŃ CHOLESTEROLU

Na rycinie 19 przedstawiono zmiany stężeń cholesterolu całkowitego, cholesterolu frakcji LDL i HDL w okresie jesiennym (**gr. J<sub>2</sub>**).

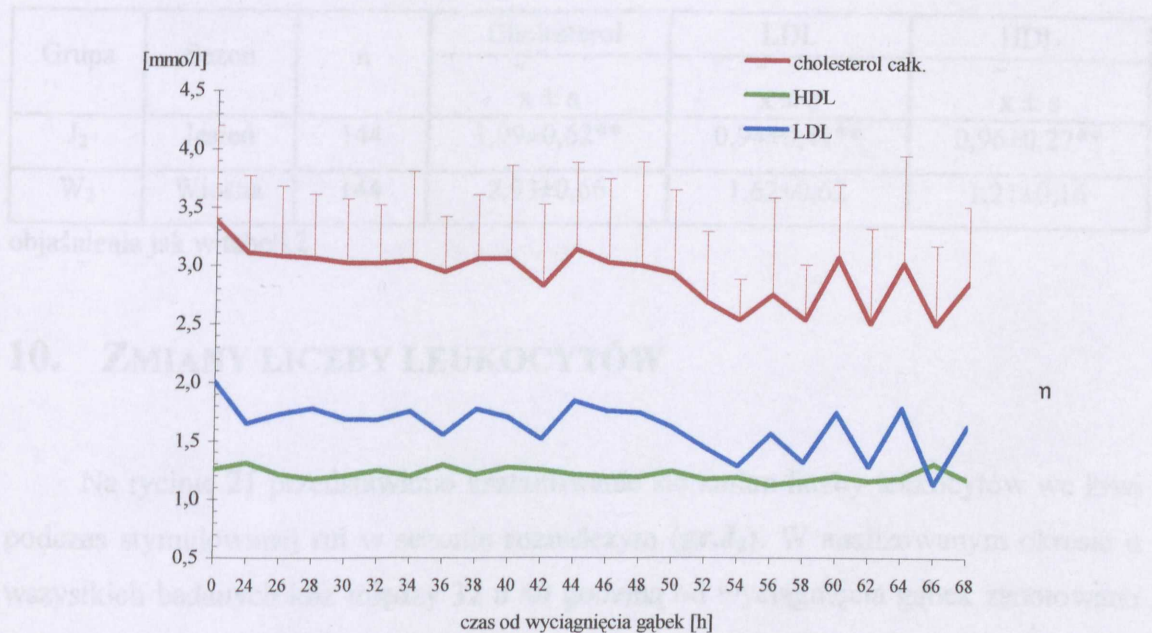
W momencie wyciągnięcia gąbek stężenie cholesterolu całkowitego wynosiło  $2,27 \pm 0,60$  mmol/l. Następnie nieznacznie wzrosło osiągając w 30 godzinie poziom  $2,56 \pm 0,80$  mmol/l. Po tym czasie zanotowano stopniowy spadek poziomu, który utrzymywał się do końca doświadczenia. W 68 godzinie stężenie cholesterolu wynosiło  $1,65$  mmol/l. Podobnie kształtował się profil stężenia cholesterolu frakcji LDL, które z poziomu wyjściowego wynoszącego  $1,06 \pm 0,56$  mmol/l wzrosło do  $1,49 \pm 0,58$  mmol/l w 30 godzinie, a następnie zaczęło obniżać się. W 68 godzinie stężenie cholesterolu LDL wynosiło  $0,72 \pm 0,50$  mmol/l. Poziom cholesterolu HDL w momencie wyciągnięcia gąbek był zbliżony do stężenia cholesterolu LDL i wynosił  $1,07 \pm 0,27$  mmol/l. Jednakże w kolejnych godzinach zanotowano niewielki spadek stężenia HDL do poziomu

$0,81 \pm 0,24 \text{ mmol/l}$  (32 godzina). Po tym czasie stężenie osiągnęło wartość wyjściową i na wyrównanym poziomie utrzymywało się do końca doświadczenia.



Ryc. 19. Profil cholesterolu podczas synchronizowanej rui w okresie jesiennym

Tab. 10. Średnie stężenie cholesterolu całkowitego, cholesterolu frakcji LDL i HDL [mmol/l] w okresie jesiennym i wiosennym



Ryc. 20. Profil cholesterolu w czasie stymulowanej rui w okresie wiosennym

Na rycinie 20 zamieszczono wykres obrazujący zmiany stężeń powyższych parametrów w grupie kóz poddanych stymulacji rui w okresie wiosennym (gr. W<sub>2</sub>).

W analizowanym przedziale czasowym zanotowano stopniowy, niewielki spadek stężenia cholesterolu całkowitego, który z poziomu wyjściowego wynoszącego  $3,39 \pm 0,81 \text{ mmol/l}$  obniżył się do  $2,88 \pm 0,66 \text{ mmol/l}$  w 68 godzinie. Profil cholesterolu frakcji LDL kształtował się podobnie. W momencie wyciągnięcia gąbek jego stężenie wynosiło  $2,01 \pm 0,73 \text{ mmol/l}$ , a w 68 godzinie -  $1,64 \pm 0,60 \text{ mmol/l}$ . Natomiast poziom cholesterolu frakcji HDL utrzymywał się na wyrównanym poziomie ( $1,21 \pm 0,16 \text{ mmol/l}$ ) przez cały badany okres.

W tabeli 10 przedstawiono zestawienie średnich stężeń cholesterolu ze wszystkich próbek pobranych w okresie jesiennym i wiosennym. W okresie wiosennym średnie poziomy cholesterolu całkowitego, frakcji LDL i HDL były istotnie wyższe ( $P \leq 0,01$ ) niż w okresie jesiennym. Ponadto w okresie jesiennym stężenie cholesterolu frakcji HDL kształtowało się na zbliżonym poziomie jak LDL i stanowiło 47,7% cholesterolu całkowitego. Natomiast w okresie wiosennym stężenie cholesterolu frakcji HDL stanowiło 40% cholesterolu całkowitego.

**Tab. 10.** Stężenie cholesterolu całkowitego, cholesterolu frakcji LDL i HDL [mmol/l] w okresie jesiennym i wiosennym

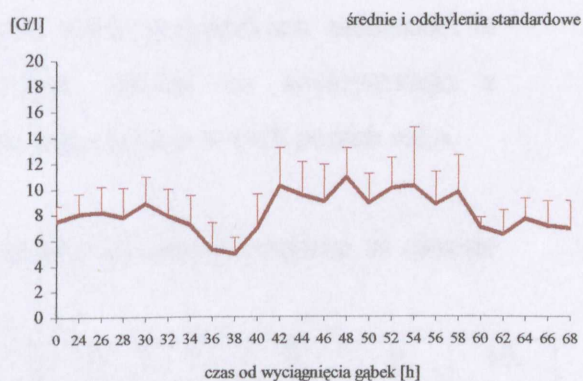
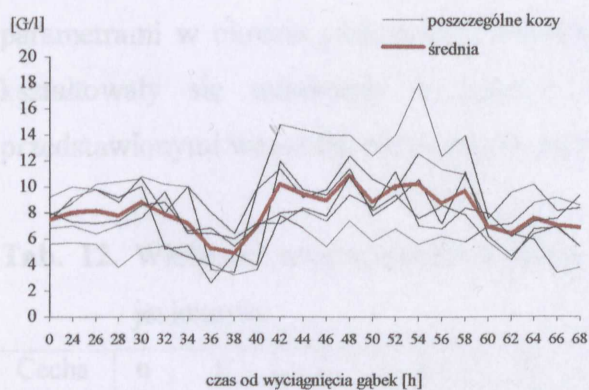
Grupa	Sezon	n	Cholesterol	LDL	HDL
			$\bar{x} \pm s$	$\bar{x} \pm s$	$\bar{x} \pm s$
J <sub>2</sub>	Jesień	144	$1,99 \pm 0,62^{**}$	$0,94 \pm 0,47^{**}$	$0,96 \pm 0,27^{**}$
W <sub>2</sub>	Wiosna	144	$2,93 \pm 0,66$	$1,62 \pm 0,62$	$1,21 \pm 0,16$

objaśnienia jak w tabeli 2

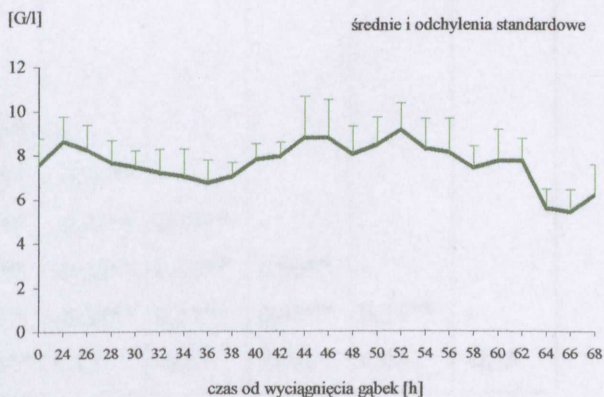
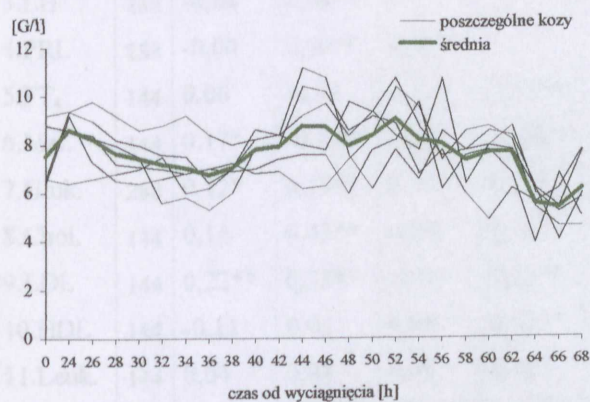
## 10. ZMIANY LICZBY LEUKOCYTÓW

Na rycinie 21 przedstawiono kształtowanie się zmian liczby leukocytów we krwi podczas stymulowanej rui w sezonie rozrodczym (gr.J<sub>2</sub>). W analizowanym okresie u wszystkich badanych kóz między 32 a 40 godziną od wyciągnięcia gąbek zanotowano spadek liczby leukocytów, która z wartości wyjściowych wynoszących średnio  $7,47 \pm 1,21 \text{ G/l}$  obniżyła się do  $4,87 \pm 1,33 \text{ G/l}$  (38godzina). Następnie liczba leukocytów gwałtownie wzrosła osiągając najwyższą wartość ( $10,90 \pm 2,21 \text{ G/l}$ ) w 48 godzinie. Podwyższona leukocytoza utrzymywała się co najmniej przez 16 godzin (od 42 do 58 godziny), po czym obniżyła się i w 68 godzinie wynosiła  $6,83 \pm 2,26 \text{ G/l}$ .

Podobną tendencję zaobserwowano w okresie wiosennym, ale zanotowane zmiany przebiegały z mniejszym natężeniem (ryc.22). W momencie wyciągnięcia gąbek liczba leukocytów wynosiła średnio  $7,53 \pm 1,22 \text{ G/l}$ . Między 32 a 38 godziną zaobserwowano spadek do wartości  $6,72 \pm 1,04 \text{ G/l}$  (36godzina), natomiast między 42 a 58 godziną liczba leukocytów utrzymywała się na podwyższonym poziomie. Najwyższa leukocytoza wystąpiła w 52 godzinie i wynosiła  $9,08 \pm 1,23 \text{ G/l}$ . W ostatnich godzinach doświadczenia liczba leukocytów spadła do wartości poniżej poziomu wyjściowego ( $6,17 \pm 1,36 \text{ G/l}$  – 68godzina).



Ryc. 21. Zmiany liczby leukocytów podczas synchronizowanej rui w okresie jesiennym



Ryc. 22. Zmiany liczby leukocytów podczas stymulowanej rui w okresie wiosennym



Tab. Zestawienie średnich wartości liczby leukocytów ze wszystkich próbek pobranych w okresie jesiennym i wiosennym zamieszczono w tabeli 11. W sezonie rozrodczym liczba leukocytów była statystycznie istotnie wyższa niż poza tym sezonem.

**Tab. 11.** Liczba leukocytów [G/l] w okresie jesiennym i wiosennym

Grupa	Rok	Sezon	n	$\bar{x} \pm s$
J <sub>2</sub>	II	Jesień	144	8,09 ± 2,65*
W <sub>2</sub>	II	Wiosna	144	7,58 ± 1,43

objaśnienia jak w tabeli 2

## 11. ZALEŻNOŚCI POMIĘDZY BADANYMI PARAMETRAMI

W tabelach 12 i 13 zamieszczono współczynniki korelacji między badanymi parametrami w okresie jesiennym i wiosennym. W wielu przypadkach zależności te kształtowały się odmiennie w jednym i drugim sezonie co koresponduje z przedstawionymi wcześniej różnicami w stężeniach wskaźników w tych porach roku.

**Tab. 12.** Wielkości współczynników korelacji między badanymi cechami w okresie jesiennym

Cecha	n	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.	9.	10.
1.P <sub>4</sub>	288	-									
2.E <sub>2</sub>	288	0,15**	-								
3.LH	288	-0,04	0,26**	-							
4.PRL	288	-0,00	0,30**	0,32**	-						
5.FT <sub>4</sub>	144	0,06	-0,04	0,21*	0,31**	-					
6.Mel.	144	0,17*	-0,33**	-0,13	-0,28**	-0,39**	-				
7.Gluk.	288	0,12*	0,19**	0,27**	0,30**	0,59**	-0,31**	-			
8.Chol.	144	0,14	0,43**	-0,01	0,39**	0,46**	-0,43**	0,47**	-		
9.LDL	144	0,22**	0,53**	-0,06	0,26**	0,28**	-0,32**	0,40**	0,90**	-	
10.HDL	144	-0,11	0,02	0,08	0,42**	0,58**	-0,38**	0,37**	0,65**	0,31**	-
11.Leuk.	144	0,04	0,03	0,08	0,02	-0,35**	0,15	-0,03	-0,02	0,06	-0,16

\*wartość współczynnika korelacji istotna przy P=0,05;

\*\* wartość współczynnika korelacji istotna przy P=0,01

**Tab. 13.** Wielkości współczynników korelacji między badanymi cechami w okresie wiosennym

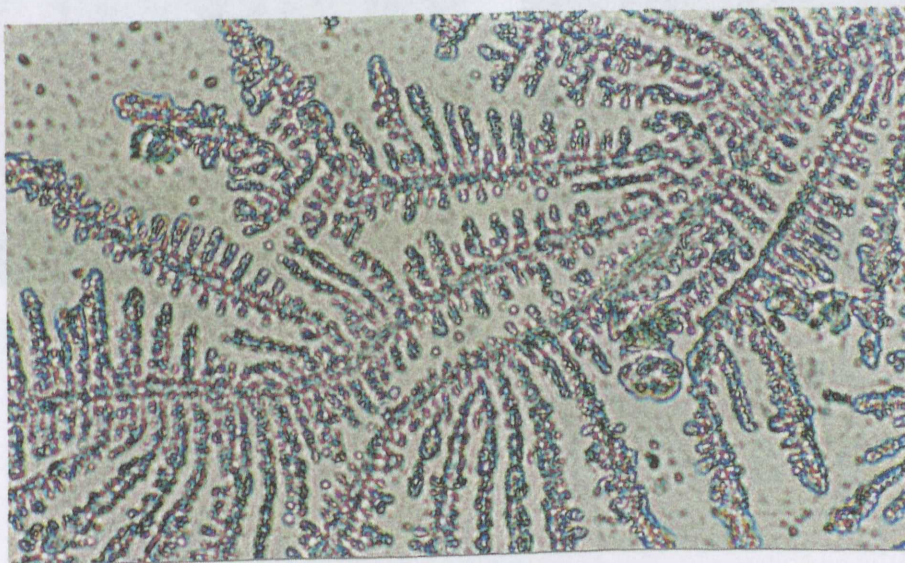
Cecha	n	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.	9.	10.
1.P <sub>4</sub>	288	-									
2.E <sub>2</sub>	288	-0,15*	-								
3.LH	288	0,02	0,37**	-							
4.PRL	288	-0,09	0,15*	0,28**	-						
5.FT <sub>4</sub>	144	-0,48**	-0,12	0,04	0,08	-					
6.MeI.	144	-0,05	0,05	0,04	-0,04	0,17*	-				
7.Gluk.	288	-0,17**	0,26**	0,19**	0,18**	-0,27**	0,06	-			
8.Chol.	144	0,26**	0,42**	0,05	-0,15	-0,35*	-0,09	0,00	-		
9.LDL	144	0,31**	0,38**	0,06	-0,18*	-0,37**	-0,08	0,06	0,97**	-	
10.HDL	144	-0,17*	0,25**	0,03	0,07	0,08	-0,04	-0,25**	0,27**	0,03	-
11.Leuk.	144	-0,04	0,20*	0,26**	0,11	-0,13	-0,15	0,21*	0,27**	0,25**	0,11

\*Wartość współczynnika korelacji istotna przy P=0,05

\*\* Wartość współczynnika korelacji istotna przy P=0,01

## 12. OBSERWACJA LAPAROSKOPOWA JAJNIKÓW I OKREŚLENIE CZASU OWULACJI

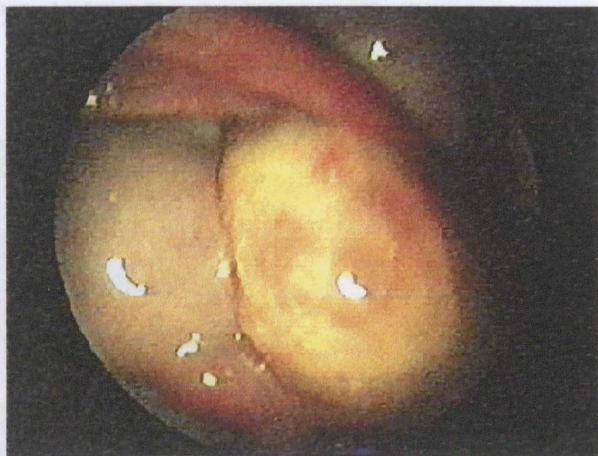
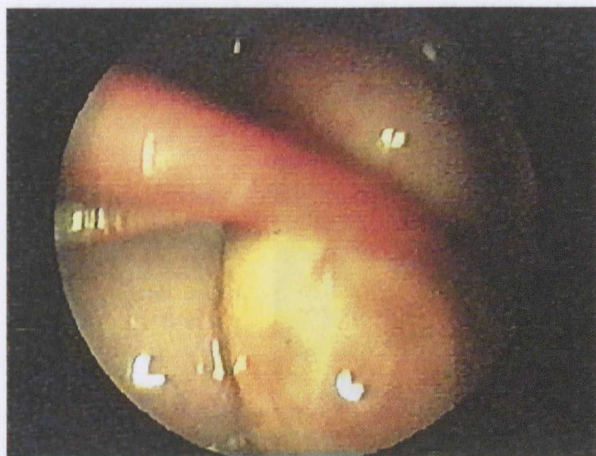
U wszystkich kóz z **grupy L** przed rozpoczęciem badania laparoskopowego zaobserwowano zmiany zewnętrznych narządów płciowych typowe dla okresu rujowego. Dodatkowym parametrem potwierdzającym wystąpienie rui była krystalizacja śluzu, którą stwierdzono u każdej badanej kozy (ryc. 23). Opierając się na tych zmianach określono, że ruja rozpoczęła się między 28 a 32 godziną od wyciągnięcia gąbek.



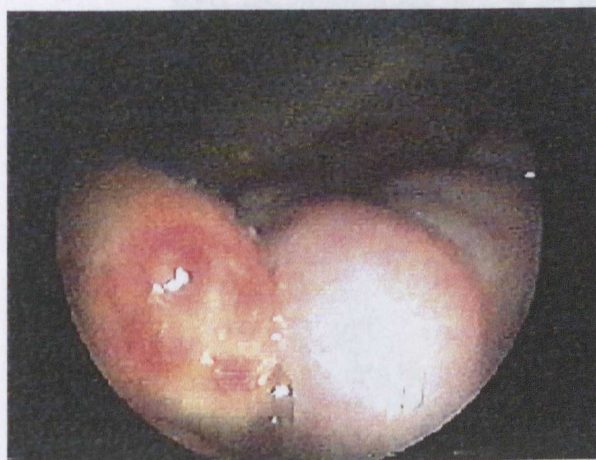
**Ryc. 23.** Krystalizacja śluzu pochwowego

Obserwacja laparoskopowa jajników przeprowadzona w 50 godzinie wykazała u jednej kozy (koza nr 1) obecność licznych małych pęcherzyków z których największy nie przekraczał 3mm średnicy.

U dwóch pozostałych kóz (koza nr 2 i 3) na obu jajnikach zaobserwowano obok licznych małych pęcherzyków jajnikowych pęcherzyki o średnicy ok. 5 - 6mm (ryc. 24, 25).

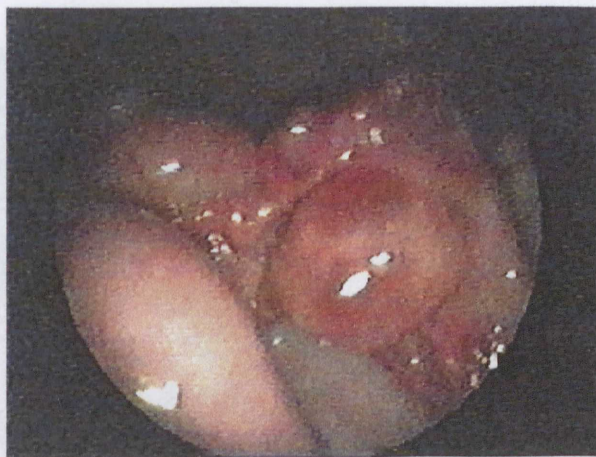


Ryc. 24. Jajniki kozy nr 3 w 50 godzinie od wyciągnięcia gąbek

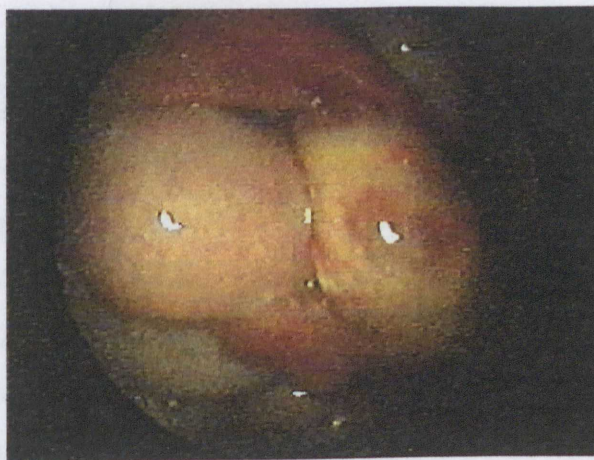


Ryc. 25. Jajniki kozy nr 2 w 50 godzinie od wyciągnięcia gąbek

W następnym badaniu wykonanym w 54 godzinie od wyciągnięcia gąbek u kozy nr 1 nie wykazano zmian w wyglądzie jajników. Natomiast u kozy nr 2 i 3 zaobserwowano obecność większych niż w badaniu pierwszym pęcherzyków jajnikowych. U kozy nr 2 na prawym jajniku widoczne były dwa pęcherzyki o średnicy ok. 8mm oraz 3 mniejsze o średnicy ok. 5mm (ryc. 26) Na jajniku lewym u tego zwierzęcia średnica największego pęcherzyka wynosiła ok. 6mm. U kozy nr 3 na jajniku prawym wykazano obecność kilku pęcherzyków o średnicy ok. 6-7mm, a na jajniku lewym dużą ilość pęcherzyków drobnych o średnicy 1-1,5mm (ryc. 27).



Ryc. 26. Jajnik kozy nr 2 w 54 godzinie od wyciągnięcia gąbek



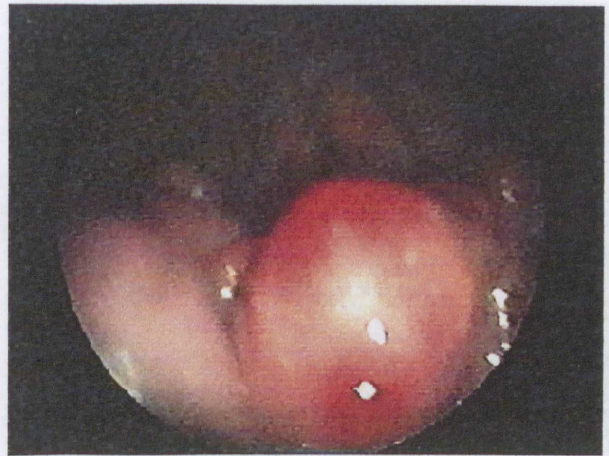
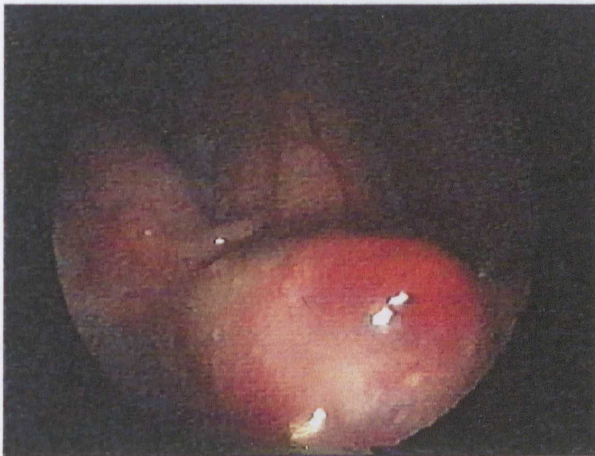
Ryc. 27. Jajnik kozy nr 3 w 54 godzinie od wyciągnięcia gąbek

Z uwagi na brak zmian w wyglądzie jajników u kozy nr 1 w kolejnym badaniu przeprowadzonym w 56 godzinie obserwację ograniczono do kozy nr 2 i 3.

U kozy nr 2 na jajniku prawym nadal obecne były dwa duże pęcherzyki, ale nie zaobserwowano pozostałych mniejszych pęcherzyków (ryc. 28). Na jajniku lewym stwierdzono obecność pęcherzyków o średnicy 4-5mm.

U kozy nr 3 na jajniku prawym obecny był jeden pęcherzyk o średnicy 7mm, a pozostałe pęcherzyki były małe. Jajnik lewy był blady, a obecne na nim pęcherzyki drobne (1-1,5mm).

Ryc. 29. Jajnik kozy nr 2 w 58 godzinie od wyciągnięcia gąbek (z ciążkiem krwawym)

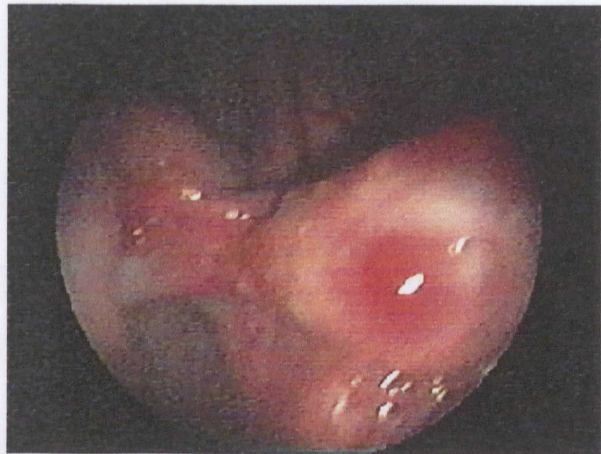


Ryc. 30. Jajnik kozy nr 2 w czasie pierwszych zmian po pierwszej owulacji (ryc. 28)

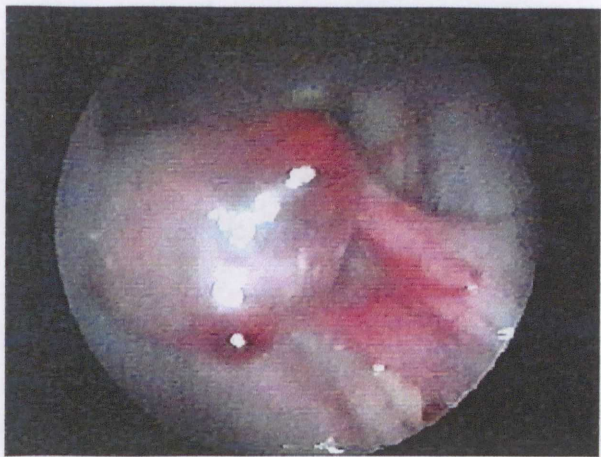
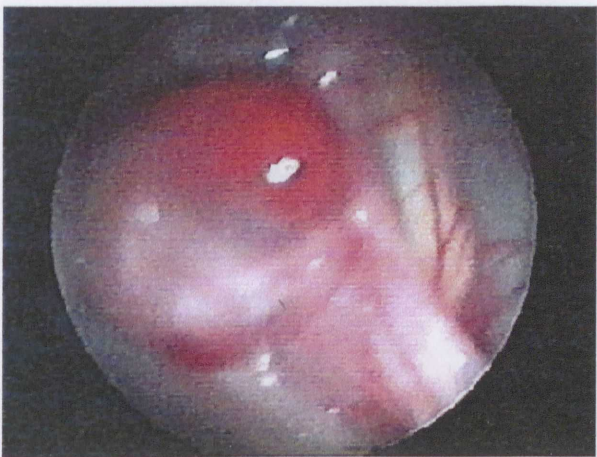
**Ryc. 28.** Jajnik kozy nr 2 w 56 godzinie od wyciągnięcia gąbek

W badaniu wykonanym w 58 godzinie od wyciągnięcia gąbek u kozy nr 1 i 3 nie stwierdzono zmian, ale u kozy nr 2 zaobserwowano zmiany świadczące o owulacji. W tym czasie zanotowano obecność ciała krwawego z wyraźną jamką powstałą po pęknięciu pęcherzyka. Ponadto prześledzono przebieg owulacji drugiego pęcherzyka, która miała miejsce w 59 godzinie od wyciągnięcia gąbek. Wygląd jajnika w tym czasie przedstawiają ryciny 29 – 35.

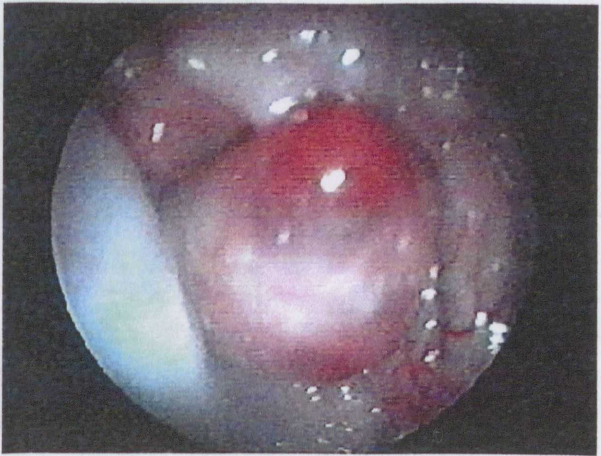
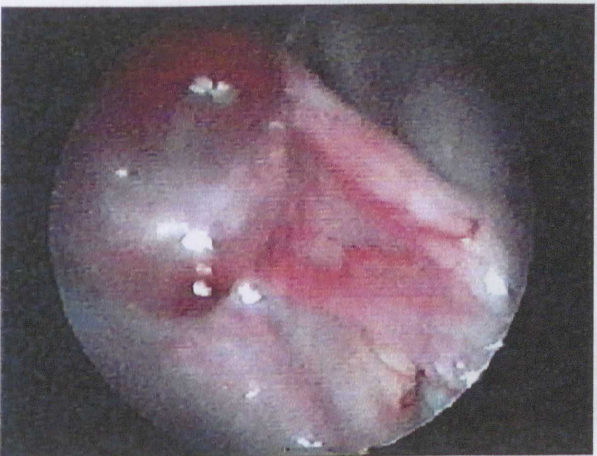
U kozy nr 1 przeprowadzono jeszcze jedną obserwację, ale w dalszym ciągu nie stwierdzono obecności pęcherzyków owulacyjnych. Natomiast u kozy nr 3 w badaniu przeprowadzonym w 70 godzinie od wyciągnięcia gąbek stwierdzono brak widocznego w poprzednich obserwacjach pęcherzyka przedowulacyjnego. Wykazano natomiast obecność ciała krwawego, co świadczyło o przebytej niedawno owulacji.



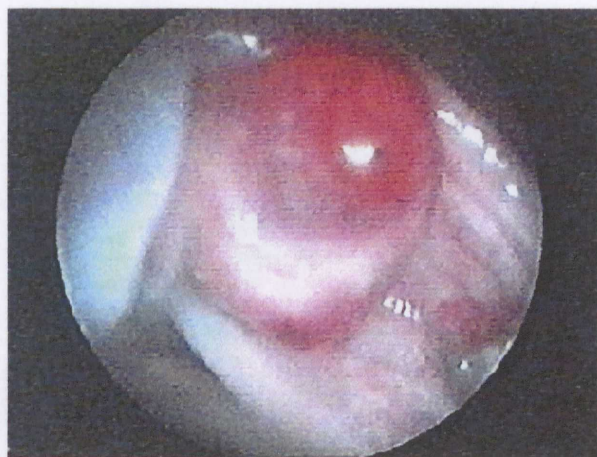
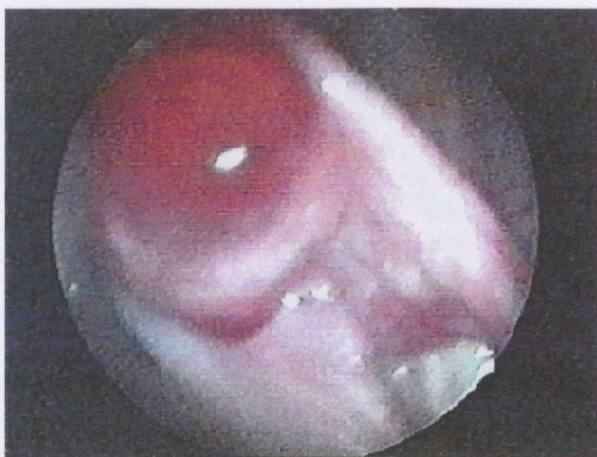
Ryc. 29. Jajnik kozy nr 2 w 58 godzinie od wyciągnięcia gąbek (z ciałkiem krwawym)



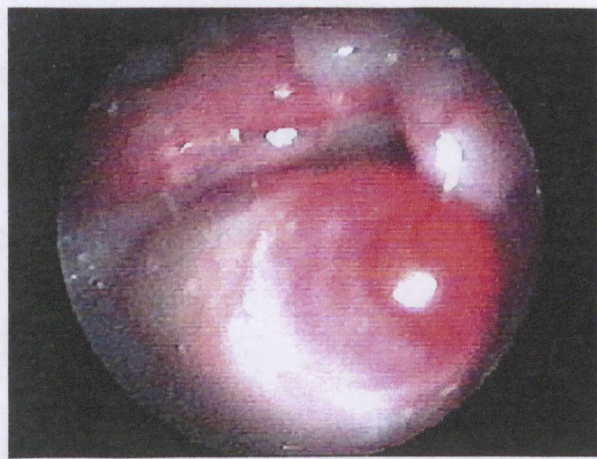
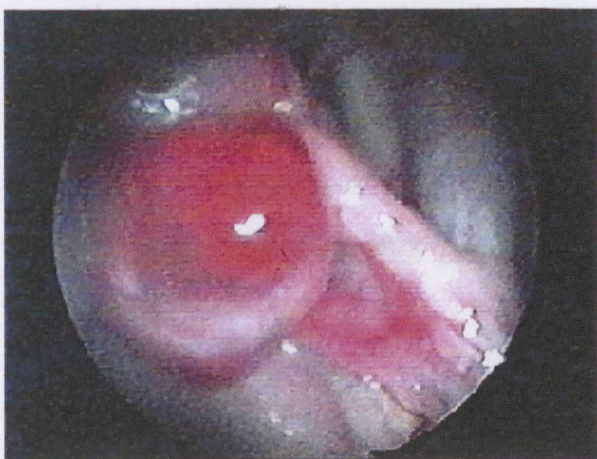
Ryc. 30. Jajnik kozy nr 2 w czasie pierwszych minut po pierwszej owulacji (po 58 godzinie od wyciągnięcia gąbek)



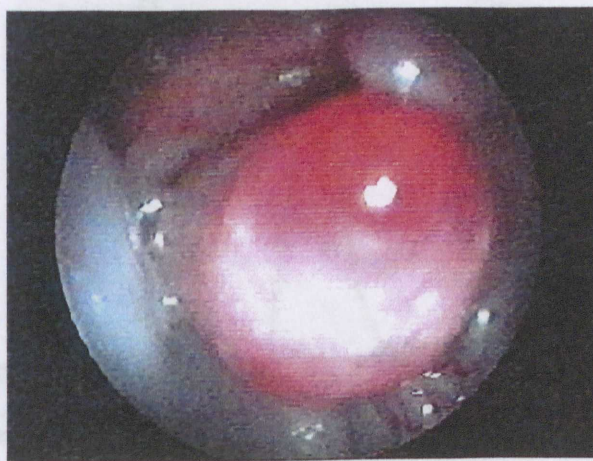
Ryc. 31. Jajnik kozy nr 2 w kolejnych minutach po pierwszej owulacji



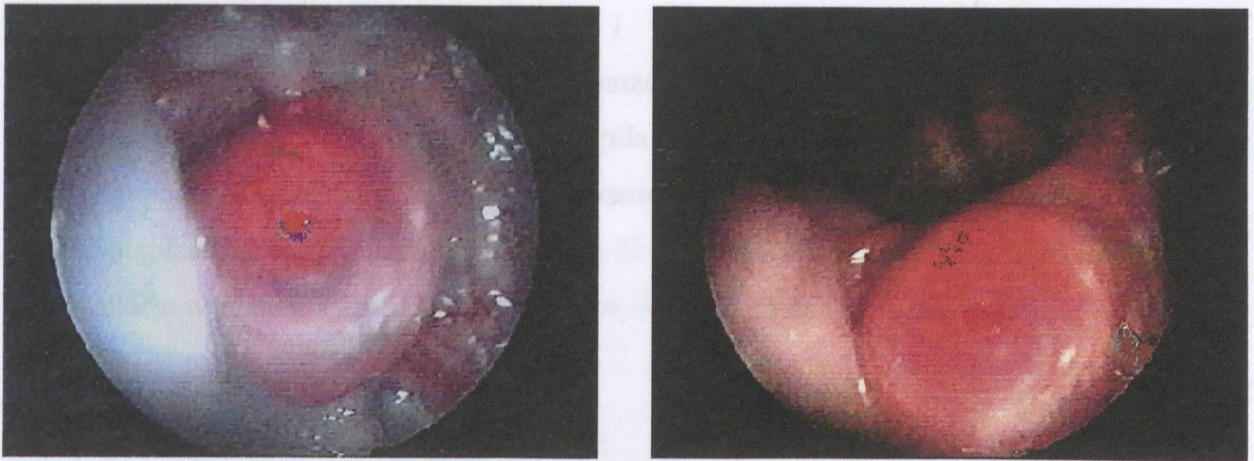
**Ryc. 32.** Jajnik kozy nr 2 bezpośrednio przed drugą owulacją



**Ryc. 33.** Jajnik kozy nr 2 w trakcie owulacji (59 godzina od wyciągnięcia gąbek)

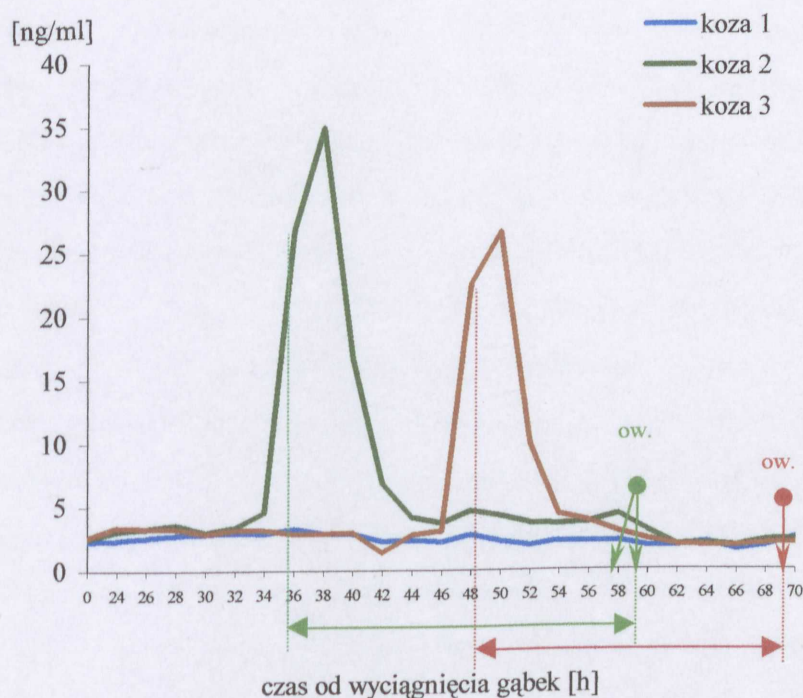


**Ryc. 34.** Jajnik kozy 2 w trakcie owulacji



Ryc. 35. Jajnik kozy nr 2 bezpośrednio po owulacji

Na rycinie 36 przedstawiono dynamikę zmian stężeń lutropiny u poszczególnych zwierząt. U kozy nr 1 stężenie LH przez cały analizowany okres utrzymywało się na wyrównanym poziomie. Natomiast u dwóch kóz (nr 2 i 3), u których stwierdzono owulację zanotowano wystąpienie „piku” LH. Czas od początku wyrzutu LH do owulacji u tych zwierząt był zbliżony i wynosił 22 godziny.



Ryc. 36. Profil lutropiny u kóz podanych badaniu laparoskopowemu



Uwzględniając powyższe zależności i wyniki uzyskane w doświadczeniu głównym z dużym prawdopodobieństwem można przyjąć, że u wszystkich zwierząt poddanych stymulacji hormonalnej wystąpiła owulacja. Przyjmując, że odstęp pomiędzy początkiem „piku” LH a jajeczkowaniem jest względnie stały wyliczono, że czas wystąpienia owulacji wahał się od 52 a 72 godziny, przy czym u 21 spośród 24 kóz owulacja wystąpiła między 56 a 66 godziną od wyciągnięcia gąbek (tab.14).

**Tab. 14.** Czas wystąpienia owulacji

	Początek „piku” LH od wyciągnięcia gąbek [h]								
	30	34	36	38	40	42	44	48	50
liczba zwierząt n=24	1	2	4	1	5	4	5	1	1
	Przewidywany czas owulacji [h] od momentu wyciągnięcia gąbek								
	52	56	58	60	62	64	66	70	72
liczba zwierząt n=24	1	2	4	1	5	4	5	1	1

## VI. OMÓWIENIE WYNIKÓW

W wyniku zastosowanej stymulacji progestagenowej i podaniu egzogennej gonadotropiny (PMSG) u wszystkich badanych kóz zaobserwowano objawy rujowe i zanotowano zmiany w uwalnianiu hormonów odpowiedzialnych za wystąpienie rui i owulacji. O tym, że zwierzęta weszły w okres rui świadczą bowiem nie tylko zmiany w zachowaniu czy zmiany w zewnętrznych narządach płciowych, ale przede wszystkim charakterystyczny dla tego okresu wzrost poziomu estradiolu wywołujący objawy rujowe. Opierając się na wynikach innych autorów [1, 119] można sądzić, że w przeprowadzonym doświadczeniu w każdej grupie zwierząt profil tego hormonu był typowy dla okresu okołorujowego ze zwiększonym uwalnianiem przed i na początku rui, a następnie spadkiem do niskich wartości utrzymujących się do czasu owulacji i w trakcie jej trwania. Fakt, że w okresie rozrodczym pierwsze symptomy rui wystąpiły wcześniej, a jej przebieg był intensywniejszy przy jednoczesnych różnicach międzysezonowych w profilach i stężeniach estradiolu potwierdza rujotwórczą funkcję tego hormonu. W sezonie rozrodczym wzmożone uwalnianie estradiolu wystąpiło wcześniej niż w okresie anestrlnym i podobne różnice dotyczyły pojawienia się pierwszych objawów rui. Również stężenie omawianego hormonu w sezonie jesiennym było wyższe niż w okresie wiosennym, co najprawdopodobniej było przyczyną różnic w intensywności przebiegu rui. Należy zaznaczyć, że estradiol może wywołać ruję tylko wtedy, gdy samica poddana jest uprzednio działaniu progesteronu [175]. Wystąpienie zewnętrznych objawów rui zależne jest bowiem od wzajemnych zależności jakie zachodzą pomiędzy progesteronem a estrogenami. W świetle badań przeprowadzonych przez Tanakę i wsp. [154] odpowiednio długi czas podwyższonego poziomu progesteronu w fazie lutealnej jest dominującym wyznacznikiem aktywności generatora pulsu GnRH, natomiast podstawowy poziom estradiolu w tym czasie jest niezbędnym czynnikiem pozwalającym na to oddziaływanie. Ważną rolę progesteronu jako wyznacznika aktywności jajnikowej potwierdza obecność krótkich faz lutealnych pojawiających się w okresie przejściowym między anestrusem a sezonem rozrodczym [17]. Uważa się, progesteron wydzielany w czasie tych krótkotrwałych epizodów odgrywa kluczową rolę w synchronizowaniu pęcherzykowego dojrzewania z falą LH, zapewniając początek prawidłowych cykli rujowych [90]. Wydaje się jednak, iż zbyt krótkie oddziaływanie progesteronu nie pozwala na ujawnienie się w czasie

pierwszego cyklu objawów rujowych. Kolejnym dowodem świadczącym o znaczeniu progesteronu jest pojawienie się odpowiedzi rujowej na stymulację progestagenową i brak takiej odpowiedzi po podaniu samego PMSG [33].

Mając na uwadze powyższe zależności można sądzić, iż zastosowana w niniejszych doświadczeniach 12-dniowa stymulacja progestagenowa była wystarczająca by uruchomić mechanizmy odpowiedzialne za wystąpienie objawów rujowych. Różnice międzysezonowe w uwalnianiu estradiolu i przebiegu rui sugerują jednak możliwość zbyt krótkiego oddziaływania „sztucznej” fazy lutealnej w okresie anestrалnym. W związku z tym interesujące byłyby badania nad kształtowaniem się stężeń hormonów sterydowych po dłuższej stymulacji progestagenowej w tym okresie. Potwierdzeniem tej sugestii są zanotowane w prezentowanej pracy międzysezonowe różnice dotyczące również uwalniania progesteronu. W grupach jesiennych stężenie tego hormonu było wyższe niż u kóz badanych w okresie wiosennym. Podobne wyniki uzyskali Buys i wsp. [25], którzy w czasie synchronizowanej rui u owiec stwierdzili wyższe stężenie progesteronu w sezonie rozrodczym niż poza sezonem. Różnice te wynikają niewątpliwie z braku funkcjonalnych ciałek żółtych w okresie anestrалnym, co według cytowanych autorów może być przyczyną niższej zapładnialności i odmiennej aktywności lutealnej w czasie ciąży. W odniesieniu do kóz jest to bardzo istotne, gdyż ciążowe ciało żółte u tego gatunku zwierząt jest głównym miejscem syntezy progesteronu przez cały okres ciąży.

Powyższe rozważania dotyczą różnic wynikających z odmiennej wrażliwości układu regulującego przebieg procesów rozrodczych u kóz w sezonie i poza sezonem rozrodczym [11, 49]. Analizując kształtowanie się profilu progesteronu stwierdzono jednak, iż był on charakterystyczny dla okresu okołorujowego. We wszystkich badanych grupach zwierząt średnie stężenie  $P_4$  utrzymywało się z niewielkimi wahaniami na niskim poziomie (poniżej 0,6ng/ml), który zgodnie z wynikami podanymi przez innych autorów [88, 119] jest typowy dla okresu okołowulacyjnego. W przeprowadzonych doświadczeniach usunięcie gąbek było z pewnością głównym czynnikiem obniżającym poziom progesteronu w okresie anestrалnym. W sezonie rozrodczym nie można jednak wykluczyć działania dodatkowego czynnika jakim jest prostaglandyna  $F_{\alpha}$ , uwalniana pod koniec naturalnej fazy lutealnej mogącej się czasowo nałożyć z fazą stymulowaną egzogennie. O możliwości nałożenia się „sztucznej” i naturalnej fazy lutealnej sugeruje podwyższony poziom progesteronu w pierwszych godzinach od wyciągnięcia gąbek u dwóch kóz z grup jesiennych (1,73ng/ml i

1,0ng/ml). W kolejnych godzinach stężenie P4 obniżyło i podobnie jak u większości kóz utrzymywało na niskim poziomie.

Niski poziom P<sub>4</sub> w tym czasie jest sygnałem odblokowującym na zasadzie ujemnego sprzężenia zwrotnego aktywność podwzgórzowo-przysadkową [154].

Z wielu badań wynika, że samo zniesienie hamującego wpływu progesteronu nie jest w stanie wywołać owulacji w okresie anestrалnym z uwagi na nie wystarczający w tym czasie zasób gonadotropin w komórkach wydzielniczych przysadki [25, 33, 134]. Potwierdzeniem powyższego spostrzeżenia mogą być zanotowane różnice międzysezonowe w stężeniach wyjściowych LH. Według Mani i wsp. [99] stężenie lutropiny w fazie folikularnej wynosi ok. 3,5ng/ml, co w prezentowanej pracy odpowiadało wartościom wyjściowym w obu grupach jesiennych. Natomiast poza sezonem w momencie wyciągnięcia gąbek stężenie LH było prawie dwukrotnie niższe niż w sezonie rozrodczym. W niniejszej pracy nie zdołano określić profilu FSH, niemniej można sądzić, iż powyższe różnice dotyczą także tej drugiej gonadotropiny odpowiedzialnej za folikulogenezę.

Dlatego też podanie PMSG było istotnym czynnikiem wzmagającym stymulujący wpływ endogennych gonadotropin na dojrzewanie pęcherzyków jajnikowych, a tym samym wzmożone wydzielanie estradiolu. Warto nadmienić, iż zbyt wysoka dawka PMSG, stosowana często w celu wywołania superowulacji, może spowodować przyspieszoną luteinizację większości pęcherzyków, które nie zdołały owulować [3]. Jabbour i Evans [67] wykazali ponadto, iż nieowulujące pęcherzyki mogą być źródłem nadmiernej ilości estradiolu, prowadzącym do powstania niekorzystnego środowiska jajowodowomacicznego utrudniającego transport plemników. Z wielu badań wynika, że w okresie przedowulacyjnym stężenie estradiolu wzrasta od wartości podstawowych wynoszących 8 -10pg/ml do poziomu ok. 32pg/ml na początku rui [1, 119]. Uzyskane w niniejszej pracy wyniki dotyczące najwyższych stężeń tego hormonu w sezonie rozrodczym mieszczą się zatem w granicach norm dla tego gatunku zwierząt, co wskazuje, iż stosowana dawka 500IU PMSG jest dawką nie powodującą nadmiernej produkcji estradiolu. Należałoby się jednak zastanowić nad zwiększeniem dawki PMSG poza sezonem rozrodczym, co być może wraz z wydłużoną stymulacją progestagenową wpłynęłoby poprzez wzrost poziomu estradiolu na zwiększenie libida u zwierząt.

W każdym badanym okresie poziom estradiolu okazał się niemniej wystarczający by na zasadzie dodatniego sprzężenia zwrotnego poprzez system neurosekrecyjny GnRH spowodować wyrzut lutropiny.

U wszystkich badanych kóz zanotowano bowiem „pik” LH, a zgodnie z modelem przyjętym przez innych autorów [52, 93] za początek wylewu LH uznano stężenie powyżej 10,0ng/ml. W przeprowadzonych doświadczeniach najwyższa wartość szczytu LH w obu grupach jesiennych i drugiej grupie wiosennej była zbliżona, natomiast w pierwszej grupie wiosennej wartość szczytu LH była niższa, a czas trwania „piku” krótszy. Nieco odmienne wyniki w tej grupie są interesujące, zważywszy ten sam termin i harmonogram doświadczenia. Nie wykluczone, iż przyczyną tych różnic były warunki atmosferyczne. Uwagę zwraca, iż w czasie poprzedzającym wyciągnięcie gąbek i w trakcie pobierania krwi wiosną w pierwszym roku wystąpił wzrost temperatury powietrza, przy jednoczesnym spadku wilgotności. Na ewentualny wpływ temperatury wskazują też wyniki uzyskane jesienią w pierwszym roku badań. W trakcie doświadczenia przeprowadzonego w tym okresie wystąpił spadek temperatury, co w pewnym stopniu korelowało z wystąpieniem wysokich wartości „piku” LH, jego trwania i stężeń średnich w badanej grupie. Z przeprowadzonych obserwacji wynika, że podobne zależności dotyczą również poziomu estradiolu. Rozważania te sugerują, iż na czynność wydzielniczą układu regulującego przebieg stymulowanej rui u kóz obok sezonowych zmian aktywności cyklicznej uwarunkowanych długością dnia może mieć wpływ temperatura i wilgotność powietrza. Sugeruje to potrzebę uwzględnienia przy synchronizacji rui również czynników atmosferycznych.

Analizując przebieg przedowulacyjnego wylewu lutropiny zauważono, że u większości badanych kóz nastąpił on po wystąpieniu najwyższego poziomu estradiolu, przy czym u niektórych zwierząt pojawił się równocześnie ze szczytem  $E_2$ . Jednakże z uwagi na różnice indywidualne w profilu uwalniania tych dwóch hormonów nie zdołano precyzyjnie określić czasowego odstępu między szczytem estradiolu i LH. Jak podają Freitas i wsp. [44] prawie zawsze obserwuje się zmienność w rozpiętości czasowej między szczytem  $E_2$  a wylewem LH. Według powyższych autorów zmienność ta dotyczy nawet tych samych zwierząt i spowodowana jest reakcjami następującymi po szczycie estradiolu.

Uwagę natomiast zwraca, iż w pierwszej grupie jesiennej, w której stężenie estradiolu było najwyższe „pik” LH utrzymywał się najdłużej i wystąpił najwcześniej. Z badań poczynionych przez innych autorów wynika jednak, że na pojawienie się przedowulacyjnej fali LH wpływa nie tylko wysokość szczytu  $E_2$ , ale równie ważny jest czas podwyższonego poziomu tego hormonu we krwi [153]. Okada i wsp. [119] w rui stymulowanej prostaglandyną  $F2\alpha$  zanotowali około 30-godzinny okres podwyższonego

poziom estradiolu osiągającego najwyższą wartość bezpośrednio przed „pikiem” LH. Z kolei Tanaka i wsp. [153] w badaniach na owariektomizowanych kozach wykazali, iż czas ten wynosi co najmniej 11 godzin. W odniesieniu do wyników uzyskanych w niniejszej pracy warunek ten wydaje się być spełniony, gdyż podwyższony poziom estradiolu utrzymywał się od 16 do 38 godzin. O wzajemnych zależnościach pomiędzy estradiolem a kształtowaniem się profilu lutropiny świadczą też wysoko istotne dodatnie korelacje, które zanotowano zarówno w sezonie jak i poza sezonem rozrodczym.

W przeprowadzonych doświadczeniach przedowulacyjny wylew LH utrzymywał się średnio przez  $7,0 \pm 1,56$  godzin (od 6 do 10h), a jego najwyższa wartość za wyjątkiem pierwszej grupy wiosennej (22,55ng/ml) wynosiła średnio 37,0ng/ml. Warto w tym miejscu porównać powyższe wyniki do wyników uzyskanych przez innych autorów. Okada i wsp. [119] u kóz rasy Shiba po indukowanej luteolizie (PGF $2\alpha$ ) zaobserwowali wystąpienie szczytu LH o amplitudzie wynoszącej ok. 60ng/ml i 6,5-godzinnym czasie trwania. W innych badaniach na tej samej rasie kóz przy analogicznej metodzie synchronizacji rui zanotowano 7,6-godzinny „pik” o wysokości ok. 30ng/ml [114]. U kóz alpejskich po stymulacji świetlnej czas trwania „piku” wynosił 9h, a jego najwyższa wartość wahała się od 40 do 70ng/ml [17]. Mani i wsp. [99] u kóz saaneńskich poddanych „terapii” progestagenowej zaobserwowali ok. 10-godzinny „pik” LH o amplitudzie 82ng/ml. Natomiast Gonzales i wsp. [52] po 11-dniowej stymulacji progestagenowej i podaniu PGF $2\alpha$  zanotowali 8,9-godzinny wylew LH o wysokości 44ng/ml. W odniesieniu do przytoczonych danych wyniki w niniejszej pracy dotyczące czasu trwania wylewu LH są zbliżone. Natomiast zanotowana wysokość amplitudy szczytu LH od większości cytowanych wartości była niższa. Przyczyną tych różnic może być odmienna wrażliwość zwierząt na stosowaną stymulację, różnice geoklimatyczne (Kalifornia-37°N, Tokio 36°3'N, Wyspy Kanaryjskie 38°N), żywienie, odmienne preparaty hormonalne czy inny schemat postępowania. Nie można też wykluczyć wpływu samca, który w niektórych cytowanych badaniach [17, 119] wykorzystywany był do wykrywania rui. Natomiast na ewentualny wpływ żywienia wskazują badania Mani i wsp. [99], którzy stosując różne modele doświadczalne wykazali znaczną redukcję wysokości fali LH już przy 25% ograniczeniu żywienia. Należy podkreślić, iż zwierzęta poddane synchronizacji rui w niniejszej pracy żywione były standardowo i nie otrzymywały dodatkowo wzbogaconej dawki pokarmowej. Sugeruje to konieczność wprowadzenia dawki o zwiększonej zawartości składników

energetycznych i odżywczych w okresie poprzedzającym i w czasie stymulacji rui. Nie wykluczone, iż zanotowane niskie wartości „piku” LH w pierwszej grupie wiosennej różniące się w porównaniu do pozostałych grup spowodowane były dodatkowo ograniczonym spożyciem paszy na skutek wzrostu temperatury powietrza. Najprawdopodobniej jednak różnice te wynikały z rzeczywistego wpływu sezonu. Podobne wyniki uzyskali bowiem Ritar i wsp. [134], którzy po stymulacji progestagenowej i podaniu PMSG w sezonie rozrodczym zanotowali wystąpienie szczytu LH o amplitudzie 54ng/ml, a poza sezonem o amplitudzie 42ng/ml.

Rozpatrując kształtowanie się profilu lutropiny ważnym jest określenie początku wyrzutu tego hormonu do krwi. W przeprowadzonych doświadczeniach przedowulacyjny wylew LH wystąpił w  $40,42 \pm 4,72$  godzinie (30-50) od momentu wyciągnięcia gąbek. Zanotowana rozpiętość czasowa pomiędzy poszczególnymi kozami wynika najprawdopodobniej z odmiennego tempa folikulogenezy i wydzielania estradiolu, chociaż w porównaniu do wyników innych autorów [45, 119] różnice te wydają się niewielkie. Istnieją sugestie pozwalające przypuszczać, iż indywidualne rozbieżności w czasie pojawienia się fali LH zależą od liczby owulujących pęcherzyków. Jak podają Baril i wsp. [8] u kóz poddanych superowulacji przedowulacyjny wylew LH następuje znacznie szybciej. Potwierdzeniem tej sugestii mogą być spostrzeżenia jakie zanotowano u zwierząt w badaniu laparoskopowym. U kozy, u której owulowały dwa pęcherzyki „pik” LH nastąpił o 12 godzin wcześniej niż u kozy z pojedynczą owulacją. Wyniki te jednak z uwagi na niewielką ilość zwierząt wymagają potwierdzenia w dalszych badaniach.

Określenie początku wyrzutu LH ma dużą wartość praktyczną, gdyż pomocne jest w ustaleniu czasu owulacji. Znaczenie przedowulacyjnej fali LH polega bowiem na uruchomieniu kaskady reakcji prowadzących nieuchronnie do pęknięcia pęcherzyka jajnikowego i uwolnienia zdolnej do zapłodnienia komórki jajowej. W ostatnich latach bliższy wgląd w procesy związane z dojrzewaniem pęcherzyków u kóz sugeruje, iż przedowulacyjna fala LH wpływa też na atreję pozostałych pęcherzyków będących w stadium zależnym od gonadotropin [52]. W niniejszej pracy znalazło to potwierdzenie podczas analizy profilu LH i zmian zachodzących na jajnikach (badanie laparoskopowe).

Uwzględniając wpływ wysokiego poziomu LH na procesy zachodzące w jajniku uważa się, iż spośród wszystkich badań hormonalnych monitorowanie „piku” LH jest najbardziej wiarygodną metodą określania czasu owulacji. Liczne dane wskazują, że

przedowulacyjny wylew LH poprzedza owulację w określonym dla danego gatunku odstępie czasu [9, 41, 150, 175]. Badania przeprowadzone u kóz wskazują jednak na pewne zróżnicowania rasowe [114, 134]. Dlatego też jednym z zadań postawionych sobie w niniejszej pracy było ustalenie odstępu czasowego między owulacją a „pikiem” LH na podstawie zmian w profilu tej gonadotropiny i wizualnej obserwacji jajników przez laparoskopię.

U jednej kozy poddanej temu badaniu owulacja nie wystąpiła i u tej też kozy profil uwalniania lutropiny nie wykazywał charakterystycznych zmian dla okresu okołowulacyjnego. Zaskakujące, że podobnie jak u pozostałych kóz w tym doświadczeniu, wystąpiły wyraźne objawy rujowe potwierdzone krystalizacją śluzu. Wskazuje to, iż ruja nie zawsze jest odpowiednikiem owulacji. Przyczyn braku odpowiedzi owulacyjnej u tej kozy należy upatrywać w mogącej się pojawić reakcji stresowej. Mimo usilnych starań, by zminimalizować działanie bodźców stresowych nie można jednak wykluczyć wpływu czynników stresotwórczych w tego typu badaniach, w których aby wychwycić moment owulacji konieczne jest kilkakrotne powtarzanie zabiegu. Konsekwencją stresu jest wzrost poziomu kortyzolu, który jak podają Martin i wsp. [100] może zablokować przedowulacyjną falę LH, a tym samym owulację. Natomiast sam fakt nie pojawienia się „piku” LH przy równoczesnym braku owulacji potwierdza kluczową rolę tego hormonu w procesach prowadzących do pęknięcia pęcherzyka jajnikowego.

U dwóch pozostałych kóz zaobserwowano zmiany na jajnikach, które wyraźnie wskazywały na owulację. U tych też zwierząt stwierdzono przedowulacyjny wylew lutropiny do krwi, który poprzedzał owulację o 22 godziny. Zbliżone wyniki zanotowano u kóz rasy Shiba, u których pomimo stosowania odmiennej stymulacji hormonalnej odstęp między „pikiem” LH a owulacją wynosił od 20 do 21 godzin [114]. Opierając się na badaniach innych autorów [9, 44, 71, 114, 134] świadczących o wysokiej korelacji między „pikiem” LH a owulacją i bazując na wynikach uzyskanych w niniejszej pracy z dużym prawdopodobieństwem można przyjąć, iż u wszystkich kóz z pozostałych grup wystąpiła owulacja, która u większości zwierząt miała miejsce między 56 a 66 godziną od wyciągnięcia gąbek.

Wyznaczenie czasu owulacji ma decydujące znaczenie w ustaleniu terminu krycia bądź inseminacji. Mając na uwadze ograniczony czas zdolności zapładniającej plemników w drogach rodnych samicy, a także czas ich kapacytacji i krótki, zaledwie kilkugodzinny okres zdolności komórki jajowej do zapłodnienia [65, 123] wskazane jest



krycie na 10-12 godzin przed owulacją. W praktyce aby zwiększyć skuteczność często stosuje się dwukrotne krycie w odstępach 12-godzinnych. Dlatego też biorąc pod uwagę uzyskane wyniki proponuje się by termin pierwszego krycia mieścił się między 44 a 46 godziną a drugiego między 54 a 56 godziną od wyciągnięcia gąbek. Wydaje się, iż terminy te są najbardziej optymalne dla tej rasy kóz utrzymywanych w naszych warunkach. Uwzględniają bowiem różnice osobnicze i międzysezonowe.

W praktyce często w określeniu czasu owulacji bazuje się na objawach rujowych, przyjmując, iż owulacja występuje pod koniec rui lub kilka godzin po jej zakończeniu [70, 135]. Rozpatrując termin owulacji w tym aspekcie można przyjąć, że w sezonie rozrodczym nastąpiła ona między 25 a 33 godziną, a poza sezonem między 21 a 29 godziną od początku rui, co jest zgodne z ogólnie znanymi założeniami. Przyjmując te kryteria należy jednak zaznaczyć, iż odstęp między początkiem rui a owulacją jest wartością zmienną i może wahać się od 9 do 37 godzin [44, 135]. Ponadto zanotowane międzysezonowe różnice w intensywności przebiegu rui stwarzają dodatkowe utrudnienia w obiektywnej ocenie czasu pojawienia się pierwszych objawów. Dlatego też jednym z celów stosowania synchronizacji rui jest uniknięcie błędów związanych z jej wykrywaniem. Dla hodowcy natomiast ważny jest optymalny termin krycia przy stosowaniu określonej stymulacji hormonalnej.

Warto nadmienić, iż znajomość czasu owulacji i odstępu między „pikiem” LH a owulacją może być też wykorzystana w wielu badaniach biotechnologicznych, np. związanych z aspiracją oocytów. Kozy stanowią bardzo podatny materiał dla tego typu eksperymentów [87].

Oprócz kształtowania się profilu omówionych hormonów w pracy postanowiono prześledzić również dynamikę zmian prolaktyny, hormonu wydzielanego przez przysadkę i związanego bezpośrednio z procesami rozrodczymi samic. Analiza profilu tego hormonu jest jednak utrudniona z uwagi na zanotowane różnice indywidualne. Zmienność ta wynika najprawdopodobniej z dużej wrażliwości układu regulującego wydzielaniem prolaktyny, który reaguje nawet na niewielkie pobudzenie [96]. Okres okołorujowy związany jest zaś ze zmianami behawioralnymi i dynamicznymi przemianami czynnościowymi całego organizmu. Jednakże mimo tych różnic zauważono też cechy wspólne. U wszystkich kóz w analizowanym okresie okołowulacyjnym zanotowano znaczny wzrost wydzielania tego hormonu będący nawet kilkakrotnie wyższy od poziomu podstawowego. Podwyższone stężenie prolaktyny w tym okresie obserwuje się również u owiec [25].

U większości badanych zwierząt wzmożone uwalnianie prolaktyny towarzyszyło podwyższonemu stężeniu estradiolu i lutropiny, co zostało potwierdzone dodatnimi korelacjami między tymi hormonami. Analiza sekwencji w uwalnianiu powyższych hormonów pozwala przypuszczać, iż zwiększone wydzielanie prolaktyny mogło być następstwem podwyższonego poziomu estradiolu. Z kolei wzrost stężenia prolaktyny utrzymujący się dłużej niż podwyższony poziom estradiolu mógł być jednym z czynników hamujących sekrecję tego sterydu. Potwierdzeniem tych sugestii są dane piśmiennictwa wskazujące, że estradiol poprzez wpływ na podwzgórzową dopaminę wzmacnia uwalnianie prolaktyny. Ponadto estradiol może pobudzać wydzielanie prolaktyny działając bezpośrednio na przysadkę [141]. Natomiast wpływ prolaktyny na spadek poziomu estradiolu potwierdzają badania Krasnowa i wsp. [83]. Cytowani autorzy wykazali bowiem, iż prolaktyna hamuje aktywność aromatazy, enzymu odpowiedzialnego za przekształcenie androgenów w estradiol. Nie można też wykluczyć, iż prolaktyna uczestniczy we wzajemnych sprzężeniach zwrotnych między steroidami a podwzgórzem [10].

Zanotowane z kolei korelacje pomiędzy prolaktyną a lutropiną mogą wynikać z luteotropowej funkcji tego hormonu, na co wskazują też inni autorzy [126, 131]. Uważa się, że prolaktyna wzmacnia działanie FSH i LH w różnicowaniu pęcherzyka jajnikowego i uczestniczy w luteinizacji jego komórek składowych [126]. Niewykluczone, że prolaktyna swoje działanie biologiczne w okresie okołouwulacyjnym wywiera poprzez wpływ na komórki układu immunologicznego [48], który w świetle badań ostatnich lat pełni istotną rolę w procesie owulacji [86, 95].

Analizując dynamikę zmian stężeń prolaktyny uwagę zwraca pulsacyjny charakter jej uwalniania, który jest właściwością sekrecyjną hormonów przysadkowych. Nie zauważono jednak okołodobowego rytmu wydzielania prolaktyny. O istnieniu zaś 24-godzinnego rytmu uwalniania tego hormonu świadczą badania wykonane między innymi na owcach [110]. Wyniki uzyskane w prezentowanej pracy wskazują zatem, iż mechanizmy regulujące wydzielanie prolaktyny w tym kulminacyjnym momencie cyklu rujowego jakim jest owulacja są złożone, a sekrecja tego hormonu być może uzależniona jest nie tylko od rytmu związanego z długością dnia.

Kolejną wspólną cechą w profilu uwalniania prolaktyny zanotowaną u badanych kóz był fakt, że w czasie przewidywanej owulacji u wszystkich zwierząt stężenie omawianego hormonu kształtowało się na poziomie podstawowym. W tym samym czasie poziom hormonów sterydowych i lutropiny utrzymywał się także na niskim

poziomie. Jak podaje Espey [41] w czasie owulacji aktywność steroidogenna zostaje „uśpiona”, a układ wydzielania dokrewnego jest faktycznie obojętny, gdyż poziom hormonów płciowych we krwi jest minimalny. Należy jednak zaznaczyć, iż profil hormonów we krwi nie jest wiernym odzwierciedleniem środowiska pęcherzyka. Przykładem może być progesteron, który odgrywa istotną rolę w dojrzewaniu oocytu i osiągnięciu zdolności komórki jajowej do zapłodnienia [149]. Natomiast stężenie tego hormonu we krwi w okresie okołooowulacyjnym jest bardzo niskie. Można zatem sądzić, że w tym czasie istnieją mechanizmy zabezpieczające przenikanie progesteronu do krwi i preferujące wykorzystanie tego hormonu na drodze parakrynej przez oocyt. Podkreślić również należy, iż bezpośrednio przed owulacją we krwi w przeciwieństwie do progesteronu wzrasta stężenie 17- $\alpha$ -hydroksyprogesteronu [41]. Nie wiadomo jednak czy podwyższony poziom tego sterydu jest konsekwencją metabolizmu progesteronu w komórkach docelowych, czy też wynika z konwersji progesteronu w komórkach steroidogennych. Nie można zatem wykluczyć, iż za procesy związane z dojrzewaniem oocytu i zapłodnieniem odpowiedzialny jest 17- $\alpha$ -hydroksyprogesteron.

W nawiązaniu do sekrecji prolaktyny należałoby przytoczyć wyniki badań przeprowadzonych przez Buysa i wsp. [25]. Cytowani autorzy tłumiąc sekrecję prolaktyny (bromokryptyną) w okresie okołooowulacyjnym u owiec nie stwierdzili by obniżony poziom tego hormonu wpłynął negatywnie na wskaźnik owulacji, funkcję powstałego ciała żółtego, zapładnialność i wielkość miotu. Sugeruje to, że pojawienie się przedowulacyjnej fali prolaktyny nie jest kluczowym momentem dla owulacji, a jej znaczenie polega prawdopodobnie bardziej na działaniu pośrednim niż bezpośrednim.

Rozpatrując profil prolaktyny pozostaje jeszcze kwestia zanotowanych różnic międzysezonowych. W okresie wiosennym w obu badanych grupach stężenie tego hormonu kształtowało się na znacznie wyższym poziomie niż w okresach jesiennych. Różnice te dotyczyły zarówno stężeń podstawowych jak i wartości maksymalnych i średnich poziomów z całego analizowanego okresu okołooowulacyjnego. Sezonowy rytm sekrecji prolaktyny u owiec i kóz ze zwiększonym wydzielaniem w okresie wydłużającego się dnia świetlnego i obniżonym w czasie dni krótkich wykazało wielu badaczy [96, 165]. Mechanizm kontrolujący roczny rytm sekrecji prolaktyny nie jest jeszcze w pełni poznany, ale istnieją dowody, że ważnym modulatorem jest długość dnia i uwalniana z szyszynki melatonina [125, 169]. W prezentowanej pracy wykazano wysoko istotną ujemną korelację pomiędzy melatoniną i prolaktyną w sezonie rozrodczym, natomiast poza sezonem korelacja ta była niewielka. Wskazuje to na

odmienną regulację wydzielania prolaktyny w anestrus i okresie estralnym. Ponadto w analizowanych okresach okołoolulatoryjnych ważnymi zmiennymi mogą być inne czynniki przyczyniające się do sezonowych różnic między wzajemnym oddziaływaniem tych hormonów.

Zanotowane w niniejszej pracy sezonowe różnice w poziomach prolaktyny oczywiście nie wyjaśniają znaczenia tego hormonu w sezonowości rozrodu. Znany jest natomiast hamujące działanie wysokich stężeń prolaktyny na oś reprodukcyjną w okresie laktacji [10], a hiperprolaktynemia u ludzi jest częstą przyczyną bezpłodności. Badania ostatnich lat nie potwierdziły jednak by podwyższony poziom tego hormonu był czynnikiem bezpośrednio hamującym aktywność cykliczną gonad w okresie anestrualnym [25]. Nie można jednak wykluczyć pośredniej roli prolaktyny w przekazywaniu informacji, że nadszedł czas korzystny bądź niekorzystny dla reprodukcji. Być może zmiany w sekrecji tego hormonu są sygnałem o stanie metabolicznym organizmu mogącym wpływać hamująco bądź pobudzająco na oś reprodukcyjną. O takiej możliwości sugerują stwierdzone w niniejszej pracy korelacje pomiędzy prolaktyną a cholesterolem całkowitym, cholesterolem frakcji HDL i LDL. W sezonie rozrodczym między tymi parametrami zanotowano wysoko istotne dodatnie korelacje, natomiast poza sezonem takich zależności nie stwierdzono, a w przypadku cholesterolu LDL wartość współczynnika korelacji była ujemna. W oparciu o te wyniki trudno o ich jednoznaczną interpretację bowiem analizowane zależności ograniczają się tylko do okresu okołoolulatoryjnego. Interesujące byłyby jednak badania o wzajemnych relacjach między prolaktyną, stanem metabolicznym organizmu a melatoniną i aktywnością rozrodczą. Ponadto istnieją dane wskazujące, że melatonina przeciwdziała zaburzeniom lipidów spowodowanych hiperprolaktynemią u szczurów redukując wysoki poziom osocznego cholesterolu [42]. Zanotowane w niniejszej pracy wzajemne zależności między melatoniną, prolaktyną a cholesterolem całkowitym i jego frakcjami zdają się potwierdzać taką możliwość również u badanych kóz. Być może kompleksowe badania prowadzone w tym kierunku doprowadzą do wyjaśnienia roli tego hormonu w sezonowości rozrodu.

O zależnościach między stanem metabolicznym organizmu a procesami rozrodczymi świadczą też liczne badania wskazujące na ważną rolę glukozy. W świetle tych badań wielokierunkowe przemiany glukozy gwarantują prawidłowy przebieg cyklu rujowego oddziałując zarówno na poziomie jajnika [130] jak i na poziomie podwzgórza i przysadki [7]. W związku z powyższym w pracy postanowiono

prześledzić nie tylko zmiany stężeń hormonów ale również innych parametrów mogących wpływać na przebieg owulacji.

W profilu glukozy w analizowanym okresie okołoowulacyjnym nie wykazano tak dynamicznych zmian jak w profilach omówionych już hormonów. Niemniej w każdej badanej grupie zwierząt zaobserwowano wzrost poziomu tego parametru do wartości przyjętych za górną granicę norm dla kóz. Natomiast pod koniec badanego okresu, w czasie przewidywanej owulacji stężenie glukozy obniżyło się do poziomów wyjściowych. Należy przypomnieć, że zwierzęta w czasie doświadczenia nie otrzymywały dawki pokarmowej o wyższej zawartości składników energetycznych. Interesujące mogą być zatem rozważania nad przyczyną takiego profilu glukozy. Przede wszystkim należy uwzględnić, że w okresie przedowulacyjnym wzrastające pęcherzyki jajnikowe wydzielają zwiększone ilości estrogenów, które obok wielu innych funkcji, wzmagają procesy kataboliczne w wątrobie związane między innymi z przemianami energetycznymi. Można więc przypuszczać, że źródłem podwyższonego poziomu glukozy była nasilona glikogenoliza stymulowana estrogenami. Uwagę zwraca, że poziom glukozy do wartości podstawowych obniżył się dopiero po „piku” LH. Niewykluczone, że estrogeny w okresie przedowulacyjnym powodują nie tylko wyrzut lutropiny, ale pośrednio odpowiedzialne są również za dostarczenie substratów energetycznych do syntezy tego hormonu. Z danych piśmiennictwa wynika, że w warunkach fizjologicznych prawidłowy model uwalniania LH trwa tak długo jak długo zwierzę może utrzymać normalne stężenie glukozy we krwi [36]. Możliwe, że obserwowany spadek poziomu glukozy w czasie przewidywanej owulacji spowodowany był wzmożonym wykorzystaniem jej przez jajnik. Z przeprowadzonych wstępnie badań własnych [dane niepublikowane] na krowach wykazano bowiem istotnie wyższy poziom glukozy w płynie pęcherzyków przedowulacyjnych niż w płynie pobranym z pęcherzyków z wcześniejszych stadiów rozwojowych. Interesujące, że poziom glukozy w pęcherzykach owulacyjnych był bardzo zbliżony do najwyższych stężeń zanotowanych w niniejszej pracy. Ponadto Boryczko i Bostedt [18] wskazali, że wzrastające stężenia glukozy w pęcherzykach są niezbędne dla ich prawidłowego rozwoju, a niedobór może być przyczyną zaburzeń owulacji z tworzeniem się torbieli jajnikowych.

W zakresie omawianych zmian stężeń glukozy warto porównać je do innych wyników. W analogicznym doświadczeniu przeprowadzonym na owcach rasy suffolk zanotowano również wzrost poziomu glukozy [15], ale wystąpił on o kilka godzin wcześniej niż

zanotowany w niniejszej pracy. Natomiast obniżenie nastąpiło, podobnie jak u badanych kóz, dopiero po „piku” LH, osiągając poziom podstawowy w czasie przewidywanej owulacji. Różnice dotyczące czasu pojawienia się podwyższonego stężenia glukozy wynikają najprawdopodobniej z wcześniejszej zdolności owczych pęcherzyków jajnikowych do produkcji estradiolu, którego wysoki poziom zanotowano już w momencie wyciągnięcia gąbek.

Wzrost poziomu glukozy w okresie okołowulacyjnym, aczkolwiek nieistotny, zanotowała również Wrońska-Fortuna [171]. Schemat badań powyższej autorki polegał jednak na analizie parametrów biochemicznych w czasie całego cyklu rujowego, podczas którego krew pobierano w odstępach dwudniowych. Dlatego też na podstawie tych badań nie można dokładnie określić profilu glukozy w okresie okołowulacyjnym, w którym przemiany zmieniają się morfologicznie i czynnościowo z godziny na godzinę. Cytowana autorka, podobnie jak w przeprowadzonej pracy, wskazuje na związek powyższych zmian ze zmianami stężeń hormonów płciowych. Potwierdzeniem tych zależności są odnotowane w niniejszej pracy wysoko istotne dodatnie korelacje między glukozą a estradiolem, lutropiną i prolaktyną, które stwierdzono w sezonie i poza sezonem rozrodczym.

Badania ostatnich lat wskazują, że ważnymi czynnikami w przebiegu owulacji, poprzez wpływ na zmiany metaboliczne i bezpośredni udział w procesach rozrodczych, mogą być hormony tarczycy [174]. Znaczenie tych hormonów dla prawidłowej funkcji procesów rozrodczych samicy wykazano w wielu pracach [101, 152]. Niewiele jest jednak danych na temat kształtowania się ich profilu w okresie okołowulacyjnym u kóz. W związku z powyższym w pracy postanowiono prześledzić zmiany stężeń wolnej tyroksyny, której oznaczenie jest najlepszym wykładnikiem aktywności hormonów tarczycy. W analizie profilu FT<sub>4</sub> uwagę zwraca wzrost jego stężeń w czasie poprzedzającym wylew LH. Sugeruje to udział tego hormonu w okresie przedowulacyjnym. Niewykluczone, że podwyższony poziom FT<sub>4</sub> jest jednym z czynników hamujących syntezę estradiolu, na co wskazują ujemne, aczkolwiek nieistotne współczynniki korelacji. Najnowsze badania Goldmana i wsp. [51] i Cecconi i wsp. [27] wskazują ponadto na udział hormonów tarczycy w owulacji i w uzyskaniu zdolności zapładniającej komórek jajowych.

Wzrost poziomu FT<sub>4</sub> zaobserwowano zarówno w sezonie jak i poza sezonem rozrodczym. Zanotowano natomiast międzysezonowe różnice w kształtowaniu się profilu FT<sub>4</sub> w czasie następującym po „piku” LH. W okresie jesiennym nastąpił spadek

stężenia FT<sub>4</sub>, który z niewielkimi wahaniami utrzymywał się do końca doświadczenia. Natomiast w okresie wiosennym zaobserwowano drugą falę podwyższonego poziomu tego hormonu. W profilu „wiosennym” daje się zauważyć wyraźny rytm dobowy ze zwiększonym uwalnianiem w godzinach wieczornych i nocnych. Te różnice w kształtowaniu się profilu FT<sub>4</sub> w czasie przewidywanej owulacji mogą wynikać z odmiennego przebiegu procesów związanych z luteinizacją i zwiększoną konwersją FT<sub>4</sub> (odjodowanie do FT<sub>3</sub>). Badania Gregoraszczuk i Piekło [55] przeprowadzone na hodowlach świńskich komórek lutealnych wykazały bowiem, że trójodotyronina bezpośrednio wpływa na mitochondrialny cytochrom P450<sub>SCC</sub> katalizujący przejście cholesterolu w progesteron. Spośród niewielu badań określających profil hormonów tarczycy w cyklu rujowym godnymi uwagi są wyniki badań Buys i wsp [25], którzy w pierwszych dniach synchronizowanej rui u owiec w sezonie i poza sezonem rozrodczym zanotowali wzrost poziomu tyroksyny. W okresie estralnym, w czasie następującym po rui, powyżsi autorzy zaobserwowali obniżenie stężenia hormonu, które na zbliżonym poziomie utrzymywało się przez całą fazę lutealną. Natomiast w okresie anestrалnym stężenie tyroksyny po spadku w czasie następującym po rui ponownie wzrosło i ten podwyższony poziom utrzymywał się przez kolejne dni. Wyniki powyższych autorów nie obrazują dokładnej dynamiki zmian tyroksyny w okresie okołooowulacyjnym, ale przedstawione przez nich profile potwierdzają zaobserwowane w niniejszej pracy różnice sezonowe i ogólną tendencję kształtowania się tego hormonu. W oparciu o przedstawione dane można przypuszczać, że rola hormonów tarczycy w sezonowych zmianach reprodukcyjnych związana może być z aktywnością lutealną. Znaczenie tyroksyny w procesach owulacyjnych i sezonowości w rozrodzie może też polegać na regulacji przemian metabolicznych bądź informowaniu organizmu o stanie energetycznym. Na taką możliwość wskazują odmiennie zależne od sezonu wartości współczynników korelacji między omawianym hormonem a oznaczonymi wskaźnikami energetycznymi. Interesujące są też relacje pomiędzy kształtowaniem się stężeń FT<sub>4</sub> a melatoniną. W okresie jesiennym wykazano wysoko istotną ujemną korelację między tymi hormonami, natomiast w okresie wiosennym wysoko istotną korelację dodatnią. Uwagę zwraca też, iż profile uwalniania wolnej tyroksyny i melatoniny w doświadczeniu przeprowadzonym wiosną były bardzo zbliżone z wyraźnym rytmem okołodobowym. Powyższe zależności potwierdzają również badania innych autorów. Rom-Bogoslavskaja i Shcherbakova [136] w doświadczeniach na szczurach wykazały, że iniekcja melatoniny w czasie „dni krótkich” obniża poziom tyroksyny, natomiast w

czasie „dni długich” podwyższa. Podobny efekt podawania melatoniny zanotowano u chomika syryjskiego [163]. Wyniki cytowanych autorów i uzyskane w niniejszej pracy sugerują istnienie odmiennych zależnych od sezonu mechanizmów kontrolujących wzajemne interakcyjne oddziaływanie tych hormonów. Pozostaje jednak pytanie, jakie ma to znaczenie w funkcjonowaniu reprodukcyjnej osi?

W niniejszej pracy międzysezonowe różnice FT<sub>4</sub> dotyczyły również stężeń średnich z całego analizowanego okresu. W okresie jesiennym poziom FT<sub>4</sub> był istotnie niższy niż wiosną. Różnice te nie są tak duże jak w przypadku stężeń prolaktyny, gdyż jak podają O’Callaghan i wsp. [117] i Webster i wsp. [168] sezonowe zmiany uwalniania tyroksyny charakteryzują się najniższymi poziomami w lecie i najwyższymi zimą. Natomiast jesienią następuje przejście od niskich poziomów do wysokich, natomiast wiosną od wysokich do niskich. Cytowani autorzy wskazują, że taki rytm uwalniania tyroksyny odgrywa ważną rolę w sezonowych zmianach sprzężeń zwrotnym między E<sub>2</sub> a GnRH i LH. Dlatego też wydaje się, iż międzysezonowe różnice w uwalnianiu estradiolu mogą być powiązane z rocznym rytmem sekrecji FT<sub>4</sub>. U kobiet estradiol wpływa na wzrost stężenia globulinowego nośnika białkowego (*Thyroxine Binding Globulin-TGB*), a tym samym na zmniejszenie stężenia wolnej tyroksyny [116]. Jeżeli tak samo jest u kóz to byłoby to wytłumaczeniem zmniejszonego poziomu FT<sub>4</sub> w sezonie rozrodczym. Natomiast wraz z zanikiem zdolności aromatyzacyjnej komórek pęcherzykowych w anestrus [11] i obniżeniem sekrecji estradiolu dochodziłoby do zwiększenia puli wolnej tyroksyny.

W szeregu opracowaniach związanych z sezonowością w rozrodzie porusza się rolę wspomnianej już melatoniny. Jej niezaprzeczalny wpływ polega na przekazywaniu informacji ze środowiska do organizmu o długości dnia świetlnego. Wzmoczona sekrecja melatoniny odbywa się bowiem w nocy natomiast w czasie dnia uwalnianie hormonu jest niewielkie [12, 78]. Jak podają Chemineau i wsp. [30] u owiec w czasie dnia poziom melatoniny we krwi nie przekracza 10pg/ml natomiast w czasie nocy wzrasta do około 100pg/ml. Dlatego też uważa się, iż hormon ten pełni kluczową rolę w sezonowych zmianach reprodukcyjnych zależnych od fotoperiodu. Nie jest natomiast dostatecznie zbadany jej bezpośredni wpływ na aktywność gonad. Niewiele też wiadomo jak kształtuje się profil melatoniny w cyklu rujowym kóz. W związku z powyższym jest ona kolejnym hormonem, którego dynamikę zmian w okresie okołowulacyjnym postanowiono prześledzić.



Profil kształtowania się stężeń melatoniny w okresie jesiennym wskazuje na niewielki tylko wzrost jej poziomu w czasie pierwszej nocy i wyraźny wzrost podczas drugiej nocy. Interesujące, że podczas gdy inne hormony wykazywały wzmożoną sekrecję, uwalnianie melatoniny było przyhamowane natomiast w czasie „ciszy” endokrynej towarzyszącej owulacji, podwyższone. Potwierdzeniem tych interakcji są wysoko istotne ujemne korelacje między melatoniną a  $E_2$ , LH, PRL i  $FT_4$ , po części omówione już we wcześniejszych partiach tego rozdziału. Na zależności między estradiolem a melatoniną zwracają uwagę też inni autorzy. Ujemną korelację między tymi hormonami (-0,52) stwierdzono u kobiet w czasie fazy folikularnej [155], a po iniekcji melatoniny u myszy zanotowano spadek poziomu estradiolu we krwi i wzrost pęcherzykowej atrezji [28]. Powyższe dane i wyniki w niniejszej pracy sugerują, że istnieje funkcjonalne powiązanie melatoniny z regulacją hormonalną cyklu płciowego, a jej działanie w tej regulacji niezależnie od gatunku może być zbliżone.

W prezentowanej pracy nie stwierdzono statystycznie istotnych różnic międzysezonowych w średnich stężeniach melatoniny. W oparciu o dane piśmiennictwa uwalnianie tego hormonu w okresie jesiennym może być zwiększone z uwagi na długość nocy [30, 31]. Wydaje się, że przyczyną tego zjawiska może być zmienność w sekrecji hormonu w czasie pierwszej i drugiej nocy w sezonie jesiennym. Ponadto w sezonie wiosennym mimo podobnej tendencji w kształtowaniu się stężeń melatoniny różnice między pierwszą a drugą nocą były mniejsze. W okresie wiosennym w okresie wiosennym dobowy rytm uwalniania melatoniny był znacznie bardziej zaznaczony, a zanotowane korelacje między tym hormonem a estradiolem i lutorpiną nieistotne. Wyniki te wskazują, że siła wzajemnych interakcji hormonów płciowych i melatoniny może zależeć od sezonu i oddziaływania innych hormonów np. tyroksyny. Nie można też wykluczyć, że funkcja melatoniny związana jest z przemianami lipidowymi. W sezonie rozrodczym wykazano bowiem wysoko istotne ujemne korelacje między melatoniną a cholesterolem i brak takich zależności w okresie anestrlnym. Wydaje się to interesujące i mogące być przesłanką dalszych badań nad dynamiką uwalniania tego hormonu.

Z uwagi na związek metabolizmu lipidów z funkcją hormonalną jajników w pracy postanowiono zwrócić uwagę na profil kształtowania się omówionych już częściowo głównych wskaźników przemiany lipidowej, a mianowicie cholesterolu całkowitego i cholesterolu frakcji LDL i HDL.

W badanym okresie okołowulacyjnym w sezonie i poza sezonem rozrodczym zanotowano stopniowe obniżanie się poziomu cholesterolu całkowitego i frakcji LDL, przy czym w okresie jesiennym spadek ten był wyraźniejszy. Kształtowanie się poziomów powyższych parametrów korelowało dodatnio ze zmianami stężeń estradiolu, przy czym w sezonie rozrodczym wartość współczynników była wyższa. Wyniki te sugerują, że jedną z konsekwencji zmian stężeń estradiolu u kóz mogą być przemiany lipidowe. Z dostępnych danych wynika, że estradiol wpływa na metabolizm lipoprotein u kobiet, czego przejawem są zmiany stężeń cholesterolu w cyklu płciowym [94]. Na podobne zależności zwraca też uwagę Wrońska-Fortuna [171].

W zakresie kształtowania się profilu drugiej frakcji cholesterolu – HDL nie zaobserwowano dużych zmian, a jej stężenie z niewielkimi wahaniami utrzymywało się na wyrównanym poziomie. Należy jednak zaznaczyć, że w okresie wiosennym zmiany stężeń HDL korelowały dodatnio z estradiolem.

W niniejszej pracy zanotowano różnice międzysezonowe średnich stężeń omawianych parametrów z istotnie wyższymi wartościami w okresie wiosennym. Niemniej w każdej badanej grupie kóz wartości dotyczące cholesterolu całkowitego mieściły się w granicach norm dla tego gatunku zwierząt [170]. Warty odnotowania są też różnice dotyczące procentowego udziału cholesterolu HDL, co jest ważniejszym wykładnikiem przemian lipoprotein niż same wartości stężeń cholesterolu. W sezonie rozrodczym stężenie cholesterolu HDL stanowiło 47,7% cholesterolu całkowitego, natomiast poza sezonem tylko 40%. Trudno o jednoznaczną interpretację tych różnic, gdyż regulacja procesów przemian lipidów może zależeć od wielu czynników takich jak aktywność ruchowa, zmiana okrywy włosowej, przyrosty masy ciała czy zmienność osobnicza. Nie można jednak wykluczyć wpływu sezonowych zmian aktywności płciowej związanych z obniżoną zdolnością do produkcji estrogenów w okresie anestrалnym.

Dodatkowym parametrem analizowanym w niniejszej pracy było określenie liczby leukocytów we krwi obwodowej. U wszystkich badanych kóz w czasie pojawienia się wylewu LH lub kilka godzin po nim zanotowano wzrost ilości leukocytów, który utrzymywał się do czasu przewidywanej owulacji. W okresie jesiennym wzrost ten był gwałtowniejszy, a u jednej kozy leukocytoza przekroczyła nawet górną granicę norm dla tego gatunku zwierząt. Jak podają Winnicka i wsp. [170] liczba leukocytów u kóz w warunkach fizjologicznych wynosi od 3,0 do 14,0G/l. Niestety uzyskanych wyników nie można porównać do innych badań, gdyż w dostępnej literaturze nie znaleziono prac omawiających kształtowanie się liczby leukocytów w

okresie okołowulacyjnym. Istnieją jednak dane wskazujące, że „zubożenie” liczby leukocytów we krwi obwodowej zmniejsza wskaźnik owulacji [95]. Powstaje zatem pytanie, czy podwyższona leukocytoza jest czynnikiem wzmagającym owulację czy raczej symptomem przebiegającego „procesu zapalnego”? Opublikowane dane wskazują bowiem, że owulacja pod wieloma względami przypomina ostry proces zapalny [20, 80] zapoczątkowany przedowulacyjnym wylewem LH i związany z destrukcją, przebudową i ze śmiercią licznych komórek [41]. Jakkolwiek by jednak nie była przyczyna wzrostu ilości leukocytów, to uzyskane wyniki wskazują, że wyrazem zmian w okresie okołowulacyjnym są nie tylko zmiany endokrynne ale również związane z układem immunologicznym.

Przeprowadzone badania wskazują, że regulacja przebiegu okresu okołowulacyjnego jest procesem bardzo złożonym, obejmującym zmiany zachodzące w całym organizmie. Dlatego też możliwości wywołania owulacji powinny być poprzedzone poznaniem fizjologicznych i biochemicznych współdziałań pomiędzy osią podwzgórzowo-przysadkowo-gonadową a innymi hormonami i czynnikami biorącymi udział w przemianach metabolicznych.

## VII. WNIOSKI

1. Zaobserwowane międzysezonowe różnice w przebiegu rui, wyrażające się obniżoną jej intensywnością w anestrus w porównaniu do okresu estralnego, spowodowane prawdopodobnie różnicami w stężeniach sterydowych hormonów płciowych, wskazują na potrzebę modyfikacji stymulacji hormonalnej zwierząt w kierunku zwiększenia aktywności sekrecyjnej jajników poza sezonem rozrodczym.
  2. Dodatnie zależności między prolaktyną a lutropiną i estradiolem sugerują synergistyczne działanie tych hormonów w przebiegu owulacji. Zróżnicowane jednocześnie powiązania prolaktyny z tyroksyną, melatoniną i cholesterolem, przy dużych różnicach międzysezonowych w jej stężeniu, wskazują na odmienne mechanizmy sekrecji tego hormonu w anestrus i okresie estralnym.
  3. Wykonane badania wykazały nieco odmienną dynamikę zmian stężenia melatoniny w sezonie i poza sezonem rozrodczym, a dobowe różnice w uwalnianiu tego hormonu wydają się być ściśle powiązane z sekrecją estradiolu i tyroksyny w okresie rujowym.
  4. Występujące różnice w sezonowym rytmie i natężeniu sekrecji tyroksyny potwierdzają, wykazany w ostatnich latach na owcach, udział hormonów tarczycy w regulacji sezonowych zmian w rozrodzie. Badania te wskazują jednocześnie na potrzebę wyjaśnienia mechanizmów oddziaływania tego hormonu na czynności rozrodcze małych przeżuwaczy.
  5. Zanotowany wzrost poziomu glukozy w okresie okołowulacyjnym potwierdza wzmocnienie metabolizmu energetycznego w organizmie samicy w czasie owulacji, a wykazane zależności między glukozą a hormonami płciowymi sugerują bezpośredni udział glukozy w regulacji hormonalnej.
  6. W przeprowadzonych badaniach stwierdzono nieco odmiennie kształtowanie się zależności między stężeniem cholesterolu całkowitego i frakcji HDL i LDL a badanymi hormonami płciowymi w sezonie i poza sezonem rozrodczym, co wydaje się być konsekwencją niższej sekrecji estradiolu w okresie anestrалnym.
  7. Wykazano, że u badanej rasy kóz owulacja występuje około 22 godziny po przedowulacyjnym wylewie LH, który z kolei występuje średnio w 40 godzinie po wyciągnięciu gąbek dopochwowych. Mając na uwadze czas życia komórki jajowej i plemników w drogach rodnych samicy oraz zmienność osobniczą proponuje się aby pierwsze krycie kóz przeprowadzać między 44 a 46 godziną, a drugie między 54 a 56 godziną po wyciągnięciu gąbek dopochwowych.
  8. Wzrost liczby leukocytów po „piku” przedowulacyjnym LH potwierdza hipotezę, że owulacja to czynnościowy stan zapalny będący efektem współdziałania układu endokrynnego i immunologicznego.
-

## VIII. PIŚMIENNICTWO

- [1] Abeyawardene S. A., Pope G.S.: Concentrations of oestradiol-17 $\beta$  in plasma and milk and progesterone in plasma during the oestrous cycle and in early pregnancy in goats. *Br. Vet. J.* 1990, 101-105.
- [2] Amsterdam A., Rotmensch S.: Structure-function relationships during granulosa cell differentiation. *Endocrine Reviews*, 1987, 8, 309.
- [3] Armstrong D.T., Pfitzner A.P., Warnes G.M., Ralph M.M., Seamark R.F.: Endocrine responses of goats after induction of superovulation with PMSG and FSH. *J.Reprod. Fert.* 1983, 67, 395-401.
- [4] Azhar S., Ida Chen Y.D., Reaven G. M.: Stimulation of Lipoprotein Receptors and Role of Lipoprotein and Cellular Cholesterol during Gonadotropin-induced Desensitization of Steroidogenic Response in Luteinized Rat Ovary. *J. Biological Chemistry.* 1983, 258 (6), 3735-3740.
- [5] Azhar S., Jairam Menon K.M.: Receptor-mediated gonadotropin action in the ovary. *J. Biological. Chemistry.* 1981, 256 (13), 6543-6555.
- [6] Baran M.: Skuteczność różnych metod synchronizacji rui u kóz na Pomorzu Zachodnim. Praca doktorska. AR. Szczecin 1999 (maszynopis).
- [7] Barb C.R., Kraeling R.R., Rampacek G.B.: Glucose and Free Fatty Acid Modulation of Growth Hormone and Luteinizing Hormone Secretion by Cultured Porcine Pituitary Cells, *J. Anim. Sci.* 1995, 73, 1416-1423.
- [8] Baril G., Leboeuf B., Saumande J.: Synchronization of estrus in goats: the relationship between time of occurrence of estrus and fertility following artificial insemination. *Theriogenology*, 1993, 40, 621-628.
- [9] Baril G., Pougard J.L., Freitas V.J.F., leboeuf B., Saumande J.: A new method for controlling the precise time of occurrence of the preovulatory gonadotropin surge in superovulated goats. *Therionology*, 1996, 45, 697-706.
- [10] Benjamisen E.: Effect of prolactin suppression on the ovarian activity in the lactating sow. *Acta Vet. Scand.* 1981, 22, 189-197.
- [11] Bister J.L., Noel B., Perrad B., Mandiki S.N., Mbayahaga J., Paquay R.: Control of ovarian follicles activity in the ewe, *Domest. Anim. Endocrinol.* 1999, 17 (2-3), 315-328.
- [12] Bittman E.L.: Melatonin and Photoperiodic Time Measurement: Evidence from Rodents and Ruminants. *Pineal Gland*, ed. R.J. Reiter, 1984, 155-180.
- [13] Błaszczuk B., Udała J., Gączarzewicz D.: Apoptoza w atrezji pęcherzyków jajnikowych. *Medycyna Wet.* 2000, 56 (3), 158-162.
- [14] Błaszczuk B., Udała J., Lasota B.: Wybrany mechanizmy regulacji regresji ciała żółtego. *Medycyna Wet.* 2000, 56 (5), 288-292.
- [15] Błaszczuk B., Udała J., Seremak B., Szatkowska I., Gączarzewicz D.: Zmiany w stężeniach hormonów płciowych i glukozy w osoczu krwi owiec rasy suffolk w okresie synchronizowanej rui. *Zesz. Nauk. AR. Mat. Symp.: Zastosowanie*
-

- biotechnologii w chowie i hodowli zwierząt oraz produkcji pasz i żywności. Miedzyszdroje 2000, 151-157.
- [16] Boland N.I., Humpherson P.G., Leese H.J., Gosden R.G.: The effect of glucose metabolism on murine follicle development and steroidogenesis in vitro, Hum. Reprod. 1994, 9(4), 617-623.
- [17] BonDurant R.H., Darien B.J., Munro C.J., Stabenfeldt G.H., Wang P.: Photoperiod induction of fertile oestrus and changes in LH and progesterone concentrations in yearling dairy goats (*Capra hircus*), J. Reprod. Fert. 1981, 63, 1-9.
- [18] Boryczko Z., Bostedt H.: Właściwości fizyczne i składniki chemiczne płynu pęcherzykowego i cyst jajnikowych bydła. Mat. VII Kongresu PTNW, Warszawa 1987, 44-45.
- [19] Bowen J.M., Keyes P.L., Warren J.S., Townson D.H.: Prolactin-induced regression of the rat corpus luteum: expression of monocyte chemoattractant protein-1 and invasion of macrophages. Biol. Reprod. 1996, 54, 1120-1127.
- [20] Brannstrom M., Mayrhofer G., Robertson S.A.: Localization of leukocyte subsets in the rat ovary during the periovulatory period. Biol. Reprod. 1993, 48 (2), 227-287.
- [21] Briski K.P., Sylvester P.W.: Role of endogenous opiates in glucoprivic inhibition of the luteinizing hormone surge and fos expression by preoptic gonadotropin-releasing hormone neurones in ovariectomized steroid-primed female rats. J. Neuroendocrinol. 1998, 10 (10), 769-776.
- [22] Bronson F., H.: Energy balance and ovulation: small cages versus natural habitats, Reprod Fert. Dev., 1998, 10, 127-137.
- [23] Bubenik G.A., Smith P.S., Schams D.: The effect of orally administered melatonin on the seasonality of deer pelage exchange, antler development, LH, FSH, prolactin, testosterone, T3, T4, cortisol and alkaline phosphatase. J. Pineal. Res. 1986, 3 (4), 331-349.
- [24] Bucholtz D.C., Vidwans N.M., Herbosa C.G., Schillo K.K., Foster D.L.: Metabolic interfaces between growth and reproduction. V. Pulsatile luteinizing hormone secretion is dependent upon glucose availability. Endocrinology 1996, 137, 601-607.
- [25] Buys N., Peeterst R., De Clerck B., Van Isterdael J., Kühn E.R., Decuypere E.: Seasonal variations in prolactin, growth hormone and thyroid hormones and the prolactin surge at ovulation do not affect litter size of ewes during pregnancy in the oestrous or the anoestrous season, J. Reprod. Fert. 1990, 90, 47-53.
- [26] Cardwell B.E., Fitch G.Q., Geisert R.D.: Ultrasonic evaluation for the time of ovulation in ewes treated with norgestomet and norgestomet followed by pregnant mare's serum gonadotropin. J. Anim. Sci. 1998, 76 (9), 2235-2238.
- [27] Cecconi S., Rucci N., Scaldaferrri M.L., Masciulli M.P., Rossi G., Moretti C., D'Armiento M., Ulisse S.: Thyroid hormone effects on mouse oocyte maturation and granulosa cell aromatase activity, Endocrinology 1999, 140 (4), 1783-1788.
-

- [28] Chan W.Y., Ng T.B.: Effects of pineal indoles on ovarian response to gonadotropin-induced ovulation in mice. *J. Neural Transm. Gen. Sect.* 1995, 100 (3), 239-246.
- [29] Chemineau P., Daveau A., Maurice F., Delgadillo J.A.: Seasonality of estrus and ovulation is not modified by subjecting female Alpine goats to a tropical photoperiod. *Small Ruminant Research*, 1992, 8, 299-312.
- [30] Chemineau P., Malpoux B., Delgadillo J.A., Guerin Y., Ravault J.P., Thimonier J., Pelletier J.: Control of sheep and goat reproduction: use of lihg and melatonin. *Anim. Reprod. Sci.* 1992, 30, 157-184.
- [31] Chemineau P., Malpoux B.: Melatonin and reproduction in domestic farm animals, *Therapie*. 1998, 53 (5), 445-452.
- [32] Crawford J.L., Shackell G.H., Thompson E.G., McLeod B.J., Hurst P.R.: Preovulatory follicle development and ovulation in the brushtail possum (*Trichosurus vulpecula*) monitored by repeated laparoscopy, *J. Reprod. Fertil.* 1997, 110 (2), 361-370.
- [33] Cunningham N.F., Saba N., Boarer C.D.H., Hattersley J.J.P.: Plasma hormone levels and reproductive behaviour in anoestrous ewes after treatment with progesterone and PMSG. *J. Reprod. Fert.* 1980, 60, 177-185.
- [34] Demonacos C.V., Karayanni N., Hatzoglou E., Tsiriyiotis C., Spandidos D.A., Sekeris C.E.: Mitochondrial genes as sites of primary action of steroid hormones, *Steroids*. 1996, 61(4), 226-32.
- [35] Dobson H., Campbell B.K., Scaramuzzi R.J.: Use of a GnRH antagonist in conjunction with low amplitude, high frequency LH pulses to induce follicular growth without an LH surge and ovulation in ewes. *Anim. Reprod. Sci.* 1997, 46 (3-4), 213-222.
- [36] Downing J.A., Joss J., Scaramuzzi R.J.: Ovulation rate and the concentrations of gonadotrophins and metabolic hormones in ewes infused with glucose during the late luteal phase of the oestrous cycle, *J. Endocrinol.* 1995, 146 (3), 403-410.
- [37] Downs S.M.: The influence of glucose, cumulus cells, and metabolic coupling on ATP levels and meiotic control in the isolated mouse oocyte, *Dev. Biol.* 1995 Feb, 167 (2), 502-512.
- [38] Downs S.M., Humpherson P.G., Martin K.L., Leese H.J.: Glucose utilization during gonadotropin-induced meiotic maturation in cumulus cell-enclosed mouse oocytes, *Mol. Reprod. Dev.* 1996, 44 (1), 121-131.
- [39] Driancourt M.A., Disenhaus C.: Lack of effects of growth hormone administration on ovarian function of lactating goats, *Anim-Reprod-Sci.* 1997, 46 (1-2), 123-132.
- [40] Driancourt M.A., Thuel B.: Control of oocyte growth and maturation by follicular cells and molecules present in follicular fluid. *Reprod. Nutr. Dev.* 1998, 38 (4), 345-362.
- [41] Espey L.L.: Ovulation as an Inflammatory Reaction – a Hypothesis. *Biol. Reprod.* 1980, 22, 73-106.
-

- [42] Esquifino A., Agrasal C., Velazquez E., Villanua M.A., Cardinali D.P.: Effect of melatonin on serum cholesterol and phospholipid levels, and on prolactin, thyroid-stimulating hormone and thyroid hormone levels, in hyperprolactinemic rats, *Life Sci.* 1997, 61(11), 1051-1058.
- [43] Fortune J.E., Sirois J., Turzillo A.M., Lavoie M.: Follicle selection in domestic ruminants. *J. Reprod. Fert.*, 1991, Suppl. 43, 187-198.
- [44] Freitas V.J.F., Baril G., Martin G.B., Saumande J.: Physiological limits to further improvement in the efficiency of oestrous synchronization in goats. *Reprod. Fertil. Dev.* 1997, 9, 551-556.
- [45] Freitas V.J.F., Baril G., Saumande J.: Estrus synchronization in dairy goats: use of fluorogestone acetate vaginal sponges or norgestomet ear implants, *Anim. Reprod. Sci.* 1996, 46 (3-4) 237-244.
- [46] Gajewski i wsp. 1997 NW Gajewski Z., Hanzen Ch., Thun R., Jędruch J., Jaworek A., Giziński S.: Zastosowanie ultrasonografii w diagnostyce klinicznej układu rozrodczego u bydła. *Nowa Wet.* 1997, r.II, nr specjalny, 33-49.
- [47] Galas J.: Wrażliwość pęcherzyków jajnikowych nornicy rudej na różne hormony – Zależność of fazy wzrostu i fotoperiodu *Post. Biol. Kom.* 1999, 26, Supl. 12, 197-200.
- [48] Gaytan F., Bellido C., Morales C., Sanchez-Criado J.E.: Both prolactin and progesterone in proestrus are necessary for the incuption of apoptosis in the regressing corpus luteum of the rat. *Biol. Reprod.* 1998, 59 (5) 1200-1206.
- [49] Gebbie F.E., Forsyth I.A., Arendt J.: Effects of maintaining solstice light and temperature on reproductive activity, coat growth, plasma prolactin and melatonin in goats. *J. Reprod. Fertil.* 1999, 116 (1), 25-33.
- [50] Goldman S., Dirnfeld M., Abramovici H., Kraiem Z.: Triiodothyronine (T3) modulates hCG-regulated progesterone secretion, cAMP accumulation and DNA content in cultured human luteinized granulosa cells. *Mol-Cell-Endocrinol.* 1993, 96 (1-2), 125-131.
- [51] Goldman S., Dirnfeld M., Abramovici H., Kraiem Z.: Triiodothyronine and follicle-stimulating hormone, alone and additively together, stimulate production of the tissue inhibitor of metalloproteinases-1 in cultured human luteinized granulosa cells. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1997, 82 (6), 1869-1873.
- [52] Gonzalez-Valle. F., Batista-Arteaga M., Gracia-Molina A.: Follicular atresia and LH concentrations during the follicular phase of the estrous cycle in the goat (*Capra hircus*), *Anim. Reprod. Sci.* 1997, 51,23-30.
- [53] Gregoraszczyk E.L.: Aktualne poglądy na regulację hormonalną ciała żółtego. *Post. Biol. Kom.* 1994, t.21, nr 2, s.207-225.
- [54] Gregoraszczyk E.L., Gertler A.: Wpływ hormonu wzrostu na steroidogenezę komórek jajnikowych. *Post. Biol. Kom.* 1999, 26, Supl. 12, 207-212.
- [55] Gregoraszczyk E.L., Piekło R.: Thyroid hormone action in porcine luteal cells. Effect of triiodothyronine on mitochondrial cytochrome P450-scc activity. *J. Physiol. Pharmacol.* 1998, 49 (3), 467-475.
-



- [56] Gregoraszczyk E.L., Skalka M.: Thyroid hormone as a regulator of basal and human chorionic gonadotrophin-stimulated steroidogenesis by cultured porcine theca and granulosa cells isolated at different stages of the follicular phase. *Reprod. Fertil. Dev.* 1996, 8 (6), 961-971.
- [57] Gregoraszczyk E.L., Słomczyńska M., Wilk R.: Thyroid hormone inhibits aromatase activity in porcine thecal cells cultured alone and in coculture with granulosa cells. *Thyroid*. 1998, 8 (12), 1157-1163.
- [58] Halercz-Nowakowska B.: Wpływ usunięcia jajników i naturalnej menopauzy na stężenia wybranych hormonów przysadkowych. 17- $\beta$  estradiolu i profil lipidowy wosoczu krwi. *Gin. Pol.* 1995, 66 (10), 553-560.
- [59] Hankiewicz M.: Synchronizacja rui u owiec metodą „Chrono- Gest”. *Przeegl. Nauk. Lit. Zoot.* 1989, 35, cz.III, 305-308.
- [60] Hayashi M., Maruo T., Matsuo H., Mochizuki M.: The biocellular effect of thyroid hormone on functional differentiation of porcine granulosa cells in culture. *Nippon. Naibunpi. Gakkai. Zasshi.* 1985, 20; 61 (10), 1189-1196.
- [61] Hayashi M., Maruo T., Matsuo H., Mochizuki M.: Effect of thyroid hormone on steroidogenic enzyme induction in porcine granulosa cells cultured in vitro. *Nippon. Naibunpi. Gakkai. Zasshi.* 1987, 20, 63 (10), 1231-1240.
- [62] He D., Funabashi T., Sano A., Uemura T., Minaguchi H., Kimura F.: Effects of glucose and related substrates on the recovery of the electrical activity of gonadotropin-releasing hormone pulse generator which is decreased by insulin-induced hypoglycemia in the estrogen-primed ovariectomized rat, *Brain. Res.* 1999, 27, 820 (1-2), 71-76.
- [63] Hillier S.G., Reichert L.E.Jr., van Hall E.V.: Control of preovulatory follicular estrogen biosynthesis in the human ovary, *J. Clin. Endocrinol., Metab.* 1981, 52, 847.
- [64] Howles C.M., Craigon J., Haynes N.B.: Long term rhythms of testicular volume and plasma prolactin concentration in rams reared for 3 years in constant photoperiod. *J. Reprod. Fert.* 1982, 65, 439.
- [65] Hunter R.H.F., Barwise L., King R.: Sperm transport, storage and release in the sheep oviduct in relation to the time of ovulation. *Br. Vet.* 1982, 138, 225-232.
- [66] Ireland J. J.: Control of follicular growth and development, *J. Reprod. Fert., Suppl.* 1987, 34, 39-54.
- [67] Jabbour H.N., Evans G.: Ovarian and endocrine responses of merino ewes following treatment with PMSG and GnRH or PMSG antiserum. *Anim. Reprod. Sci.* 1991, 24, 259-270.
- [68] Jablonka Shariff A., Olson L.M.: The role of nitric oxide in oocyte meiotic maturation and ovulation: meiotic abnormalities of endothelial nitric oxide synthase knock-out mouse oocytes. *Endocrinology.* 1998, 139 (6), 2944-2954.
- [69] Jakowicki J.A.: Molekularne podstawy owulacji. *Post. Biol. Kom.* 1999, 26, Supl. 12, 129-137.
- [70] Janowski T., Zduńczyk S.: Regulacja hormonalna cyklu rujowego u kóz i owiec. *Nowa Wet.* 1998, r.II, nr specjalny, 17-19.
-

- [71] Jaśkowski J.M.: Interrelationship between vaginal mucus resistance, rectal and vaginal temperature and preovulatory LH peak and ovulation in cows. *Bull. vet. Inst. Pulawy*. 1995, 39, 43-47.
- [72] Jaśkowski J.M.: Możliwość sterowania płodnością owiec przez optymalizację żywienia lub wykorzystanie środków farmakologicznych. *Przegl. hod.* 1994, nr 4, 19-21.
- [73] Jendryczko A.: Dlaczego tlenek azotu? *Post. Nauk. Med.* 1994, 7, 209-211.
- [74] Kajta M.: Interakcje hormonalne w przedowulacyjnych pęcherzykach jajnikowych szczura. Praca doktorska. UJ. Kraków 1995 (maszynopis).
- [75] Kareta W.: Inseminacja owiec i kóz w Polsce ze szczególnym uwzględnieniem prac prowadzonych w Instytucie Zootechniki. *Biul. Inf. IZ.* 1996, R.XXXIV, nr 2, 31-39.
- [76] Kareta W.: Wykorzystanie biotechnicznych metod kierowania rozrodem owiec w obecnej sytuacji owczarstwa. *Biul. Inf. IZ.* 1996, R.XXXIV, nr 1, 5-8.
- [77] Kareta W., Roberzyński M., Bochenek M., Wujec J., Kurpiewski J.: Wpływ progesteronu na wywoływanie rui i skracanie stanówek u owiec. *Rocz. Nauk. Zoot.* 1993, t.20, z.2, 105-113.
- [78] Karsch F.J.: A Role for Melatonin as a Timekeeping Hormone in the Ewe, *J. Neural. Transm.* 1986 Suppl. 21, 109-124.
- [79] Karsch F.J., Goodman R.L., Legan S.J.: Feedback basis of seasonal breeding: test of an hypothesis. *J. Reprod. Fert.* 1980, 58, 521-535.
- [80] Karstrom Encrantz L., Runesson E., Bostrom E.K., Brannstrom M.: Selective presence of the chemokine growth-regulated oncogene alpha (GRO-alpha) in the human follicle and secretion from cultured granulosa-lutein cells at ovulation. *Mol. Hum. Reprod.* 1998, 4 (11), 1077-1083.
- [81] Kennaway D.J., Rowe S.A.: Melatonin binding sites and their role in seasonal reproduction. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 1995, 49, 423-435.
- [82] Kosowicz J.: Prolaktyna (PRL). Lutropina (LH). w: *Metody radioimmunologiczne i radiokompetycyjne stosowane w klinice*, red. F. Kokot, R. Stupnicki, PZWL. Warszawa 1979, 101-121.
- [83] Krasnow J. S., Hickey G.J., Richards J. S.: Regulation of aromatase mRNA and estradiol biosynthesis in rat ovarian granulosa and luteal cells by prolactin. *Mol. Endocrinol.*, 1990, 4, 13-18.
- [84] Krzymowski T., Stefańczyk-Krzymowska S.: Centralna i lokalna regulacja rozrodu samic – Osiągnięcia polskiej placówek badawczych. *Post. Biol. Kom.* 1999, 26, Supl. 12, 23 – 35.
- [85] Krzysiek J., Gregoraszczyk E.: Regulacja steroidogenezy komórek warstwy ziarnistej. *Endokr. Pol.* 1993, 44 (4), 573- 587.
- [86] Kutteh W.H., Moldoveanu Z., Mestecky J.: Mucosal immunity in the female reproductive tract: correlation of immunoglobulins, cytokines, and reproductive hormones in human cervical mucus around the time of ovulation. *AIDS Res.Hum. Retroviruses.* 1998, 14 Suppl 1, 51-55.
-

- [87] Kühholzer B., Müller S., Besenfelder U., Prokofiev M., Ernst L.K., Brem G.: Laparoscopic recovery of pronuclear-stage goat embryos, *Vererinary Record*, 1998, 142, 40-42.
- [88] Lalev I., Ralchev I., Kanchev L., Bankov N.: A time of manifestation and duration of oestrus in goats induced by diferent schemes of treatment during the reproductive season, *Macedonian J. Reprod.*, 1996, 2 (2p), 199-204.
- [89] Lebech A.M., Kjaer A., Lebech P.E.: Metabolic changes during the normal menstrual cycle: longitudinal study. *Am. J. Obstet. Ginecol.* 1990, 163, 414-416.
- [90] Legan S. J., l'anson H., Fitzgerald B. P., Akaydin M. S. Jr.: Importance of Short Luteal Phases in the Endocrine Mechanism Controlling Initiation of Oestrus Cycles in Anestrous Ewes, *Endocrinology* 1985, 117, 11530-1536.
- [91] Lehman N.M., Robinson J.E., Karsch F.J, Silverman J.: Immunocytochemical localization of luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) pathways in the sheep brain during anestrus and the mid luteal phase of the estrous cycle, *J. Comp. Neurol.*, 1986, 244, 19-35.
- [92] Llewelyn C.A., Ogaa J.S., Obwolo M.J.: Plasma progesterone profiles and variation in cyclic ovarian activity throughout the year in indigenous goats in Zimbabwe. *Anim. Reprod. Sci.* 1993, 30, 301-311.
- [93] Llewelyn C.A, Perrie J., Luckins A.G., Munro C.D.: Estrus in the British White goat: timing of plasma luteinizing hormone surge and changes in behavioral and vaginal traits in relationship to onset of estrus. *Br. Vet. J.* 1993, 149, 171-182.
- [94] Lyons-Wall P.M., Choudhury N., Gerbrandy E.A., Truswell A.S.: Increase of high-density lipoprotein cholesterol at ovulation in healthy women. *Atherosclerosis*. 1994, 105 (2), 171-178.
- [95] Machelon V., Émilie D.: Production of ovarian cytokines and their role in ovulation in the mammalian ovary, *Eur .Cytokine Netw.* 1997, 8 (2), 1997, 137-143.
- [96] Maeda K.I., Mori Y., Kano Y.: Superior cervicla ganglionectomy prevents gonadal regression and increased plasma prolactin concentrations induced by long days in goats. *J. Endocr.* 1986, 110,137-144.
- [97] Malinowska A.: *Biochemia zwierząt*. SGGW. Warszawa 1997.
- [98] Mani A.U., McKelvey W.A.C., Watson E.D.: The effects of low level of feeding on response to synchronization of estrus, ovulation rate and embryo loss in goats. *Therionology* 1992, 38, 1013-1022.
- [99] Mani A.U., McKelvey W.A.C., Watson E.D.: Effect of undernutrition on gonadotrophin profiles in non-pregnant, cycling goats, *Anim. Reprod. Sci.* 1996, 43, 25-33.
- [100] Martin G.B., Oldharn C.M., Lindsay D.R.: Effect of stress due to laproscopy on plasma cortisol levels, the preovulatory of LH, and ovulation in the ewe. *Therionology*, 1981, 16, 39-43.
-

- [101] Maruo T., Katayama K., Barnea E.R., Mochizuki M.: A role for thyroid hormone in the induction of ovulation and corpus luteum function. *Horm. Res.* 1992, 37 Suppl 1, 12-18.
- [102] Maruo T., Hayashi M., Matsuo H., Yamamoto T., Okada H., Mochizuki M.: The role of thyroid hormone as a biological amplifier of the actions of follicle-stimulating hormone in the functional differentiation of cultured porcine granulosa cells. *Endocrinology*. 1987, 121 (4), 1233-1241.
- [103] Max A., Witkowski M., Jurka P., Boryczko Z.: *Medycyna Wet.* 1994, 50 (6), 276-279.
- [104] Mayerhofer A., Dissen G.A., Costa M.E., Ojeda S.R.: A role for neurotransmitters in early follicular development: induction of functional follicle-stimulating hormone receptors in newly formed follicles of the rat ovary. *Endocrinology* 1997, 138, 3320-3329.
- [105] Mbayaha J., Mandiki S.N.M, Bister J.L., Paquay R.: Body weight, oestrous and ovarian activity in local Burundian ewes and goats after parturition in the dry season, *Anim. Reprod. Sci.* 1998, 51, 289-300.
- [106] McCann J.P., Hansel W.: Relationships between insulin and glucose metabolism and pituitary-ovarian functions in fasted heifers, *Biol-Reprod.* 1986, 34 (4), 630-641.
- [107] Medina Ch.L., Nagatani S., Darling T.A., Bucholtz D.C., Tsukamura H., Maeda K., Foster D.L.: Glucose availability modulates the timing of the luteinizing hormone surge in the ewe, *J.Neuroendocrinol.* 1998, 10 (10), 785-792.
- [108] Mielniczuk M., Boryczko Z., Udała J., Witkowski M.: Ocena skuteczności wybranych metod synchronizacji rui i stymulacji owulacji u owiec poza sezonem rozrodczym. *Med. Wet.* 1996, 52 (3), 185-187.
- [109] Misztal T.: Melatonina - hormon sezonowości rozrodu u owiec. *Post. Nauk Rol.* 1996, 6, 43-58.
- [110] Misztal T., Romanowicz K., Barcikowski B.: Effects of melatonin infused into the III ventricle on prolactin,  $\beta$ -endorphin and luteotropin secretion in ewes during the different stages of the reproductive cycle. *Acta Neurobiol. Exp.* 1996, 56, 769-778.
- [111] Misztal T., Romanowicz K. Barcikowski B.: Rola melatoniny w sekrecji prolaktyny u owiec. *Post. Biol. Kom.* 1999, 26, Supl. 12, 117-123.
- [112] Moenter S.M., Caraty A., Karsch F.J.: The estradiol-induced surge of gonadotropin-releasing hormone in the ewe. *Endocrinology*. 1990, 127 (3), 1375-1384.
- [113] Mori Y., Tanaka T., Hamada T., Takeuchi Y.: Electrophysiological correlates of GnRH secretion. *Anim. Reprod. Sci.* 1996, 42, 537-550.
- [114] Mori Y., Kano Y.: Changes in plasma concentrations of LH, progesterone and estradiol in relation to the occurrence of luteolysis, oestrus and time of ovulation in Shiba goat (*Capra hircus*). *J. Reprod. Fert.* 1984, 72, 223-230.
- [115] Nagatani S., Tsukamura H., Murahashi K., Bucholtz D.C., Foster D.L., Maeda K.: Paraventricular norepinephrine release mediates glucoprivic suppression of
-

- pulsatile luteinizing hormone secretion. *Endocrinology*. 1996, 137 (8), 3183-3186.
- [116] Nauman J., Nauman A.: Wływ ciąży na tarczycę. *Medipress Gin*. 1997, 3 (2), 2-4.
- [117] O'Callaghan D., Karsch F.J., Boland M.P., Hanrahan J.P., Roche J.F.: Variation in the timing of the reproductive season among breeds of sheep in relation to differences in photoperiodic synchronization of an endogenous rhythm. *J. Reprod. Fertil.* 1992, 96 (2), 443-452.
- [118] O'Callaghan D., Wendling A., Karsch F.J., Roche J.F.: Effect of exogenous thyroxine on timing of seasonal reproductive transitions in ewes. *Biol. Reprod.* 1993, 49 (2), 311-315.
- [119] Okada M., Hamada T., Takeuchi Y., Mori Y.: Timing of proceptive and receptive behavior of female goats in relation to the preovulatory LH surge. *J. Vet. Med. Sci.* 1996, 58 (11), 1085-1089.
- [120] Ott R.S., Nelson D.R., Hixson J.E.: Effect of presence of male on initiation of estrous cycle activity of goats. *Theriogenology*. 1980, 13, 2, 183-190.
- [121] Ott R.S., Nelson D.R., Hixson J.E.: Peripheral Serum Progesterone and Luteinizing Hormone Concentrations of Goats During Synchronization of Estrus and Ovulation with Prostaglandin F<sub>2α</sub>. *Am. J. Vet. Res.* 1980, 41, 1432-1434.
- [122] Pawlicki B.: Rola szyszynki w fizjologii i patologii. *Kosmos* 1999, 1 (242), 29-42.
- [123] Pearce D.T., Robinson T.J.: Plasma progesterone concentrations, ovarian and endocrinological responses and sperm transport in ewes with synchronized oestrus. *J. Reprod. Fert.* 1985, 75, 49-62.
- [124] Poretsky L., Kalin M.F.: The gonadotropic function of insulin. *Endocr. Rev.* 1987, 8 (2), 132-141.
- [125] Poulton A. L., English J., Symons A. M., Arendt J.: Changes in plasma concentrations of LH, FSH and prolactin in ewes receiving melatonin and short-photoperiod treatments to induce early onset of breeding activity. *J. Endocr.* 1987, 112, 103-111.
- [126] Przała J., Przała F.: Regulacja owulacji u ssaków. w: : Ultrastruktura i funkcja komórki. red. Sz. Biliński, Z. Bielańska- Osuchowska, J. Kawiak, A. Przełęcka. Tom 6. PWN. Warszawa 1994.
- [127] Ptaszyńska M.: Sterowanie rozrodem owiec przy pomocy preparatów firmy Intervet. *Nowa Wet.* 1998, r.II, nr specjalny, 24-39.
- [128] Pu S., Kalra P.S., Kalra S.P.: Ovarian steroid-independent diurnal rhythm in cyclic GMP/nitric oxide efflux in the medial preoptic area: possible role in preovulatory and ovarian steroid-induced LH surge. *J. Neuroendocrinol.* 1998, 10 (8), 617-625.
- [129] Rabiee A.R., Lean I.J., Gooden J.M., Miller B.G.: Short-term studies of ovarian metabolism in the ewe. *Anim. Reprod. Sci.* 1997, 47, 43-58.
- [130] Rabiee A.R., Lean I.J., Gooden J.M., Miller B.G.: Relationships among metabolites influencing ovarian function in the dairy cow. *J. Dairy Sci.* 1999 Jan, 82 (1), 39-44.
-

- [131] Rajkumar K., Couture R.L., Murphy B.D.: Binding of high-density lipoproteins to luteal membranes: The role of prolactin, luteinizing hormone, and circulating lipoproteins. *Biol. Reprod.* 1985, 32, 546-555.
- [132] Reiter R.J., Li K., Gonzalez Brito A., Tannenbaum MG., Vaughan M.K., Vaughan GM., Villanua M.A.: Elevated environmental temperature alters the responses of the reproductive and thyroid axes of female Syrian hamsters to afternoon melatonin injections. *J. Pineal. Res.* 1988, 5 (3), 301-315.
- [133] Restall B.J.: Seasonal variation in reproductive activity in Australian goats. *Anim. Reprod. Sci.* 1992, 27, 305-318.
- [134] Ritar A. J., Maxwell W.M.C., Salamon S.: Ovulation and LH secretion in the goat after intravaginal progestagen sponge-PMSG treatment. *J. Reprod. Fert.* 1984, 72, 559-563.
- [135] Romano J.E., Fernandez A.: Effect of service on duration of oestrus and ovulation in dairy goats. *Anim. Reprod. Sci.* 1997, 47, 107-112.
- [136] Rom-Bugoslavskaja E.S., Shcherbakova V.S.: Seasonal characteristics of the effect of melatonin on thyroid function, *Biull. Eksp. Biol. Med.* 1986, 101 (3), 268-269.
- [137] Roy S.K., Terada D.M.: Activities of glucose metabolic enzymes in human preantral follicles: in vitro modulation by follicle-stimulating hormone, luteinizing hormone, epidermal growth factor, insulin-like growth factor I, and transforming growth factor beta 1, *Biol. Reprod.* 1999, 60 (3), 763-768.
- [138] Rubio J.M., Hallford D.M., Hawkins D.E.: Effect of glucose administration during the estrous cycle on serum hormone profiles, mRNA for steroidogenic enzymes, and breeding performance of ewes, *J. Anim. Sci.* 1997, 75 (3), 775-780.
- [139] Schwarzw T., Wierzchoś E.: Wzrost pęcherzyków jajnikowych w cyklu rujowym kóz. *Medycyna Wet.* 2000, 56 (3), 194-197.
- [140] Schwarzw T., Zięba D., Nowe poglądy na wzrost i selekcję pęcherzyków jajnikowych u przeżuwaczy. *Medycyna Wet.* 1999, 55 (3), 163-166.
- [141] Skałba P.: Endokrynologia ginekologiczna. Wyd. 2. PZWL. Warszawa 1998.
- [142] Skrzypczak J. Steroidogeneza w jajniku w fazie wzrostowej cyklu. *Post. Biol. Kom.* 1999, 26, Supl. 12, 139-149.
- [143] Słomczyńska M.: Receptory hormonów steroidowych w jajniku świni. *Post. Biol. Kom.* 1999, 26, Supl. 12, 193-196.
- [144] Sobkowiak A. Trzeciak W.H.: Budowa i funkcja receptora folitropiny. *Post. Biol. Kom.* 1999, 26, (2), 401-425.
- [145] Stewart R.E., Spicer L.J., Hamilton T.D., Keefer B.E.: Effects of insulin-like growth factor I and insulin on proliferation and on basal luteinizing hormone-induced steroidogenesis of bovine thalcal cells: involvement of glucose and receptors for insulin-like growth factor I and luteinizing hormone. *J. Anim. Sci.* 1995, 73 (12), 3719-3731.
- [146] Stevens A., Lowe J.S.: *Histologia*. Wyd. Med. Słotwiński Verlag. Brema 1994.
-

- [147] Szkilnik R., Brus R., Konecki J., Głowacka M., Sawczuk K., Nytko Ł.: Wływ inhibitora syntazy tlenu azotu (name) i donora tlenu azotu (argininy) na wychwytywanie znakowanej glukozy w tkankach szczura. *Ann. Acad. Med. Siles.* 1996, 31, 29-36.
- [148] Szoltyś M.: Struktura i funkcja pęcherzyków jajnikowych ssaków. *Post. Biol. Kom.* 1992, 19, 221-238.
- [149] Szoltyś M.: Funkcja komórek ziarnistych wzgórka jajonośnego. *Post. Biol. Kom.* 1999, 26, Supl. 12, 189-192.
- [150] Taborowski Z.: Mechanizmy odpowiedzialne za pęknięcie pęcherzyka jajnikowego u ssaków. *Przegl. Zool.* 1989, XXXIII, nr 1, s.52-59.
- [151] Talbot P., Martin G.G., Ashiby H.: Formation of the rupture site in preovulatory hamster and mouse follicles: loss of the surface epithelium. *Gamete Res.* 1987, 17, 287-302.
- [152] Tamura K., Hatsuta M., Watanabe G., Taya K., Kogo H.: Inhibitory regulation of inhibin gene expression by thyroid hormone during ovarian development in immature rats. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1998, 6, 242 (1), 102-108.
- [153] Tanaka T., Mori Y., Hoshino K.: Hypothalamic GnRH pulse generator activity during the estradiol-induced LH surge in ovariectomized goats. *Neuroendocrinology.* 1992, 56, 641-645.
- [154] Tanaka T., Ozawa T., Hoshino K., Mori Y.: Changes in the Gonadotropin Releasing Hormone Pulse Generator Activity during the Estrous Cycle in the Goat. *Neuroendocrinology* 1995, 62, 553-561.
- [155] Tang P.L., Chan T.Y., Tang G.W., Pang S.F.: Plasma melatonin profile and hormonal interactions in the menstrual cycles of anovulatory infertile women treated with gonadotropins. *Gynecol-Obstet-Invest.* 1998; 45 (4), 247-252.
- [156] Tsukahara S., Tsukamura H., Foster D.L., Maeda K.I.: Effect of corticotropin-releasing hormone antagonist on oestrogen-dependent glucoprivic suppression of luteinizing hormone secretion in female rats, *J. Neuroendocrinol.* 1999, 11(2), 101-105.
- [157] Turi A., Garzetti G.G.: The pattern of melatonin in amenorrheic women affected by sterility. *Acta. Eur. Fertil.* 1993, 24 (2), 71-74.
- [158] Tutka P., Kleinrok Z.: Rola tlenu azotu w procesach fizjologicznych i patologicznych ośrodkowego układu nerwowego. *Post. Hig. Med. Dośw.* 1995, 49 (2), 189-199.
- [159] Udała J., Błaszczak B.: Wybrane mechanizmy regulujące sezonowy przebieg procesów rozrodczych u owiec i kóz. *Medycyna Wet.* 1999, 55 (11), 733-736.
- [160] Udała J.: Wykorzystanie zmiany rytmu oświetlenia w regulacji procesów rozrodczych u owiec. *Przegl. hod.* 1988, 13, 23-24.
- [161] Udała J.: Fizjologiczne i praktyczne aspekty synchronizacji rui u owiec. *Przegl.hod.* 1996, 1, 9-11.
- [162] Udała J.: Fizjologiczne uwarunkowania sezonowości rozrodu u owiec. *Nowa Wet.* 1998, r.II, nr specjalny, 48-54.

- [163] Vaughan M.K., Richardson B.A., Petterborg L.J., Holtorf A.P., Vaughan G.M., Champney T.H., Reiter R.J.: Effects of injections and/or chronic implants of melatonin and 5-methoxytryptamine on plasma thyroid hormones in male and female Syrian hamsters. *Neuroendocrinology*. 1984, 39 (4), 361-366.
- [164] Veldhuis J.D., Klase P., Hammond M.: Divergent effects of prolactin upon steroidogenesis by porcine granulosa cells in vitro: Influence of cytodifferentiation. *Endocrinology*. 1980, 107, 42-46.
- [165] Von Brackel-Bodenhausen A., Wuttke W., Holtz W.: Effects of photoperiod and slow-release preparations of bromocryptine and melatonin on reproductive activity and prolactin secretion in female goats. *J. Anim. Sci.* 1994, 72 (4), 955-962.
- [166] Wakim N.G., Ramani N., Rao C.V.: Triiodothyronine receptors in porcine granulosa cells, *Am. J. Obstet. Gynecol.* 1987, 156 (1), 237-240
- [167] Wakim A.N., Polizotto S.L., Buffo M.J., Marrero M.A., Burholt D.R.: Thyroid hormones in human follicular fluid and thyroid hormone receptors in human granulosa cells. *Fertil-Steril.* 1993, 59 (6), 1187-1190.
- [168] Webster J.R., Moenter S.M., Woodfill C.J., Karsch F.J.: Role of the thyroid gland in seasonal reproduction. II. Thyroxine allows a season-specific suppression of gonadotropin secretion in sheep. III. Thyroidectomy blocks seasonal suppression of gonadotropin-releasing hormone secretion in sheep. *Endocrinology* 1991, 129 (3), 1635-1643.
- [169] Williams L.M., Lincoln G.A., Mercer J.G., Barrett P., Morgan P.J., Clarke I.J.: Melatonin receptors in the brain and pituitary gland of hypothalamo-pituitary disconnected Soay rams. *J. Neuroendocrinol.* 1997, 9 (8), 639-643.
- [170] Winnicka A., Kluciński W., Sitarska E., Degórski A., Sikora J.: Wartości referencyjne badań morfologicznych i biochemicznych krwi obwodowej kóz.. *Zesz. Nauk. SGGW*, 1997, 1, 103-108.
- [171] Wrońska-Fortuna D.: Some metabolic indicators in sheep blood plasma in different phases of estrous cycle. 7<sup>th</sup> International Symposium, Molecular and Physiological Aspects of Regulatory Processes of the Organism, Kraków 1998, 345.
- [172] Yellon S.M., Foster D.L., Longo L.D., Suttie J.M.: Ontogeny of the pineal melatonin rhythm and implications for reproductive development in domestic ruminants. *Anim. Reprod. Sci.* 1992, 30, 91-112
- [173] Zgliczyński W., Rosłanowska E., Stopińska-Głuszak U., Dębski R., Korzycki J., Jeske W., Witkowski M.: Współczesne metody monitorowania okresu okołooowulacyjnego. *Endoke. Pol.* 1987, 37, Supl. 1, 171.
- [174] Zhang S.S., Carrillo A.J., Darling D.S.: Expression of multiple thyroid hormone receptor mRNAs in human oocytes, cumulus cells, and granulosa cells. *Mol. Hum. Reprod.* 1997, 3 (7), 555-562.
- [175] Zięcik A.: Hormony przysadki w regulacji czynności jajnika. *Zesz. Probl. Post. Nauk Rol.* 1984, 309, 71-90.







Biblioteka Główna  
Zachodniopomorskiego Uniwersytetu  
Technologicznego w Szczecinie

CZ 59021



001-059021-00-0