

Eesti Maaülikool  
Veterinaarmeditsiini ja loomakasvatuse instituut

Andres Aljas

**PIIMA PROGESTEROONISISALDUSE DÜNAAMIKA SUPEROVULEERITUD  
EMBRÜODOONORLEHMADEL**

Veterinaarmeditsiini eriala lõputöö

**Tartu 2012**

Otsus kaitsmisele lubamise kohta:

Juhendajad: vanemteadur Jevgeni Kurõkin,

\_\_\_\_\_

(allkiri)

\_\_\_\_\_

(kuupäev)

professor Andres Valdmann

\_\_\_\_\_

(allkiri)

\_\_\_\_\_

(kuupäev)

## SISUKORD

1. LÜHENDITE LOETELU .....	4
2. KOKKUVÕTE.....	5
3. SUMMARY .....	6
4. SISSEJUHATUS.....	7
5. KIRJANDUSE ÜLEVAADE .....	8
5.1. Sissejuhatus.....	8
5.2. Superovulatoorset reaktsiooni mõjutavad faktorid .....	10
5.3. Hormoonide seos superovulatoorse reaktsiooniga.....	11
6. UURIMUSTÖÖ EESMÄRK .....	14
7. MATERJAL JA METOODIKA .....	15
7.1. Katseloomad ja uurimisperiood .....	15
7.2. Embrüodoonorite töötlemine superovulatsiooni esilekutsumiseks.....	16
7.3. Piimaproovide kogumine ja progesterooni analüüs.....	17
7.4. Ultrasonograafilised uuringud .....	18
7.5. Andmete statistiline analüüs .....	18
8. TULEMUSED.....	19
9. ARUTELU .....	23
10. JÄRELDUSED.....	25
11. KASUTATUD KIRJANDUS .....	26
12. TÄNUAVALDUSED .....	31

## 1. LÜHENDITE LOETELU

FSH	folliikuleid stimuleeriv hormoon
FSH-P	sea folliikuleid stimuleeriv hormoon
LH	luteiniseeriv hormoon
p	statistiline olulisus
PGF <sub>2</sub> α	prostaglandiin F <sub>2</sub> α
PMSG	tiine mära seerumgonadotropiin
ROC	suhteliste töökarakteristikute kõvera analüüs
TMS	tiine mära seerum

## 2. KOKKUVÕTE

### Piima progesteroonisisalduse dünaamika superovuleeritud embrüodoonorlehmadel

Antud töös uuriti hormooni progesteroon dünaamikat 21 superovuleeritud embrüodoonorlehmalt ja tehti kindlaks progesteroonisisalduse kriteeriumid superovulatoorse reaktsiooni prognoosimiseks.

Superovulatsiooni miseks töödeldi embrüodoonoreid prostaglandiin  $F_2\alpha$  (*the hormone prostaglandin  $F_2\alpha$* ,  $PGF_2\alpha$ )(Dinolytic®, Pharmacia N.V/S.A., Puurs, Belgia) ning folliikuleid stimuleeriva hormooni (*follicle stimulating hormone*, FSH)(Folltropiin®, Bioniche Teo Inverin, Co. Galway, Dublin, Iirimaa) preparaatidega. Vastavalt katseskeemile koguti lüpsijärgselt katseloomadelt piimaproovid progesterooni kontsentratsiooni määramiseks monoklonaalsel antikehal põhineva ensüümimmunoloogilise analüüsi abil. Embrüote loputuspäeval tehti kindlaks superovulatoorne reaktsioon. Superovulatsiooni suurus määrati embrüote loputuspäeval rektaalsel palpatsioonil, munasarjades formeerunud kollakehade arvu järgi. Määratud progesterooni kontsentratsioone võrreldi ovulatoorse reaktsiooni suurusega (munasarjades formeerunud kollakehade arvuga).

Uuringu tulemusena tehti kindlaks, et hormonaalse töötlemise järel esines embrüodoonorite vahel märkimisväärne erinevus superovulatoorse reaktsiooni suuruses. Kokku uuringus kasutatud 21 lehmast 10 lehmalt oli superovulatoorne reaktsioon madal, keskmiselt  $3,3 \pm 2,3$  kollakeha ja 11 lehmalt kõrge, keskmiselt  $10,1 \pm 2,7$  kollakeha ühe doonori kohta. Andmete statistilisest analüüsist suhteliste töökarakteristikute kõvera analüüsi abil selgus, et superovulatoorse reaktsiooni prognoosimiseks optimaalsed progesteroonisisalduse kriteeriumid 28. päeval ( $PGF_2\alpha$  manustamine kollakeha taandarengu indutseerimiseks) on 12,86 ng/ml (64% tundlikkusega, 90% spetsiifilisusega) ja 37. ehk embrüote loputamispäeval 23,5 ng/ml (91% tundlikkusega, 80% spetsiifilisusega). Nende andmete abil on võimalik prognoosida superovulatoorse reaktsiooni tekkimist piimalehmadel.

Märksõnad: embrüodoonorid, progesteroon, superovulatsioon

### 3. SUMMARY

#### **Milk progesterone dynamics in superovulated embryodonor cows**

In the present study milk progesterone dynamics in 21 superovulated embryodonors was studied and optimal cutpoints for the progesterone concentrations for prediction of superovulatory response were found. To induce superovulation, embryodonors were treated by using prostaglandin F<sub>2</sub>α (Dinolytic®, Pharmacia N.V/S.A., Puurs, Belgia) and follicle stimulating hormone (FSH, Folltropin®, Bioniche Teo Inverin, Co. Galway, Dublin, Ireland) preparations. According to experimental schedule milk was sampled for measurements of progesterone. Progesterone was measured using an enzyme immunoassay modified by using the second antibody technique. On the day of the flushing of embryos superovulatory reaction was evaluated by transrectal palpation or ultrasonographical examination of the ovaries, based on the number of formed corpora lutea. Progesterone concentrations were related to the superovulatory reactions. Based on the superovulatory response two groups were formed with high and low number of corpora lutea.

The results of the study indicated differences between the two groups. From the 21 donors used, in 10 cows superovulatory reaction was low, (mean  $3.3 \pm 2.3$  corpora lutea), and in 11 cows superovulatory reaction was high ( $10.1 \pm 2.7$  corpora lutea per donor). Optimal progesterone concentrations in milk for prediction of the superovulatory reaction were found by ROC curve analyses. Optimal progesterone concentrations were 12,86 ng/ml (sensitivity 64%, specificity 90% ) on the day 28 (PGF<sub>2</sub>α treatment for induction of regression of corpora lutea), and 23,5 ng/ml (sensitivity 91%, specificity 80%) on the day 37 (flushing of embryos), respectively. These results suggest that milk progesterone analyses can be used for prediction of superovulatory response in dairy cows.

Keywords: embryo-donor, progesterone, superovulation

#### 4. SISSEJUHATUS

Veiste sigimispotentsiaali suurendamiseks on kasutusel kunstlik seemendus ja embrüosiirdamine. Antud reproduktsiooni biotehnoloogia valdkonna meetodid võimaldavad järglaste saamiseks kasutada palju väiksemat arvu vanemaid, võrreldes veiste loomuliku taastootmisega. Kunstliku seemenduse abil on võimalik suurendada mitmekordselt järglaste arvu nendelt pullidelt, kelle emad on silmapaistvad kõrge toodangu poolest. Embrüosiirdamine võimaldab madala geneetilise potentsiaaliga emadelt saada geneetiliselt kõrge väärtusega järglasi.

Uurimustöö eesmärk on uurida piima progesteroonisisalduse dünaamikat embrüodoonorlehmadel ning leida võimalikud progesterooni piirväärtused superovulatoorse reaktsiooni prognoosimiseks.

## 5. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

### 5.1. Sissejuhatus

Vaatamata veiste kõrgele reproduktiivsele potentsiaalile, limiteerib nende geneetilist parandamist emasloomade suhteliselt madal taastootmise tase. Sünninud lehmvasika munasarjades on primordiaalseste folliikulite populatsioon 133 000-200 000 (Ericksson, 1966; Beckers *et al.*, 1996), mis on munarakkude allikaks ka suguküpsel emasloomal. Isegi 15 kuni 20 aasta vanustel lehmadel leidub munasarjades ligi 3 000 folliikulit (Ericksson, 1966). Hoolimata nii suurest folliikulite arvust munasarjades, sünnib veistel tavaliselt üks vasikas korraga.

Embrüosiirdamise tehnoloogia võimaldab doonorloomadelt koguda suurel hulgal morfoloogiliselt kvaliteetseid, siirdamiseks kõlblike embrüoid. Embrüote saamiseks in vivo kasutatakse doonorite kombineeritud töötlemist gonadotroopsete hormoonide ja prostaglandiin  $F_2\alpha$  preparaatidega. Folliikulaarkasvu hormonaalse stimuleerimise abil kutsutakse esile doonorite munasarjades mitmete folliikulite kasv.  $PGF_2\alpha$  abil toimub kollakeha taandareng, mille järel munarakud valmivad ja vabanevad folliikulitest suhteliselt üheaegselt. Sellist ovulatsiooni nimetakse superovulatsiooniks. Superovulatoorse reaktsiooni edukust hinnatakse toimunud ovulatsioonide, vabanenud munarakkude ning seemendusjärgselt arenenud embrüote hulga järgi.

Viimase 30 aasta uuringute põhjal selgub, et doonorlehmade superovulatoorse reaktsiooni suurus on varieeruv (Tabel 1). Superovulatsiooni esilekutsumisel doonoritest 13% kuni 40% kas ei reageeri, või produtseerivad väga väikese arvu (kuni 3) embrüoid (Guilbault *et al.*, 1991; Christie *et al.*, 1992; Henriquez *et al.*, 1996, Peippo *et al.* 2009). Ühe reageerinud ja loputatud doonori kohta saadakse keskmiselt 5-7 siirdamiseks sobivat embrüot (Callesen *et al.*, 1992; Lohuis *et al.*, 1993; Lange, 1995; McGuirk, 1995; Gordon, 1996; Hayakawa *et al.*, 2009; Peippo *et al.* 2009). On täheldatud, et talveperioodil on saadavate embrüote hulk suurem kui suveperioodil ning ka viljastumine on talveperioodil paremate tulemustega (Chebel *et al.*, 2008).



Tabel 1. Superovulatoorse reaktsiooni varieeruvus doonorloomade munasarjades

Preparaat	Doonorite arv	Reaktsioon (kollakehade arv)	Autorid
FSH, TMS	1214	7,76	Nibart, 1983
FSH	16	11,6 ± 1,4	Alcivar <i>et al.</i> , 1984
PMSG	6	27,7 ± 8,2	Yadav <i>et al.</i> , 1986
FSH	6	8,0±3,2	Yadav <i>et al.</i> , 1986
FSH	10	8,7±2,7	Belevich <i>et al.</i> , 1986
FSH	16	16,1	Hay <i>et al.</i> , 1990
FSH	90	9,5±0,7	Herrler <i>et al.</i> , 1990
FSH	9	15,1±1,5	Guibault <i>et al.</i> , 1991
FSH	18	13,2±1,6	Bo <i>et al.</i> , 1991
FSH	42	14,3±0,9	Romero <i>et al.</i> , 1991
FSH	10	5,2±1,3	Kasiraj <i>et al.</i> , 1992
Folltropin (600 mg)	11	25,0±6,6	Hockley <i>et al.</i> , 1992
Folltropin (800 mg)	11	13,9±2,3	Hockley <i>et al.</i> , 1992
FSH	32	12,3±8,0	Yamamoto <i>et al.</i> , 1994
FSH	27	12,2±3,9	Satoh <i>et al.</i> , 1996
Folltropin	22	17,7±2,1	Kelly <i>et al.</i> , 1997
FSH	10	18±2,8	M.A. de Feu <i>et al.</i> , 2007

## 5.2. Superovulatoorset reaktsiooni mõjutavad faktorid

Munasarjade reaktsiooni hormonaalsel stimuleerimisel doonorloomadel ning morfoloogiliselt kvaliteetsete embrüote saamist mõjutavad paljud faktorid. On leitud erinevused munasarjade superovulatoorses reaktsioonis erinevate veisetõugude vahel (Donaldson, 1984), näiteks teatud geneetiliste omadustega loomad, kellel on eelsoodumus mitmeks samaaegselt ovulatsiooniks (mitmikute sünnitamine), annavad ka suurema superovulatoorse reaktsiooni (Bindon *et al.*, 1986; Synder, 1986). Folliikulid alustavad oma kasvu ja diferentseerumist munasarjades 40-60 päeva enne ovuleerumist (Lussier *et al.*, 1987). Folliikulite kasv ja areng kuni ovulatsioonini on otseselt seotud doonorloomade söötmis-pidamis tingimuste ning toodanguga. Puudulik söötmine kutsub esile hormonaalsed häired, mitte ainult munasarjades vaid ka hüpofüüsi ja hüpotalamuse tasandil, mis häirib folliikulite normaalset arengut (Murphy *et al.*, 1991; Schillo, 1992). Superovulatsiooni mõjutavateks faktoriteks on doonorloomade üldine tervislik seisund ja nende sigimisvõime, munasarjade seisund hormoonide manustamise ajal (funktsionaalsus, folliikulite arengustaadium, kollakeha formeerumine ja selle aktiivsus), kasutatavate gonadotroopsete preparaatide bioloogiline puhtus, aktiivsus, nende doos (Hockley *et al.*, 1992) ja manustamise viis (Kasiraj *et al.*, 1992; Yamamoto *et al.*, 1994).

Superovulatoorset reaktsiooni mõjutavad poegimisjärgne periood ning innatsükli päev, millal alustatakse follikulaarkasvu stimuleerimist (Boland *et al.*, 1991). Optimaalne aeg eksogeensete hormoonide manustamiseks superovulatsiooni esilekutsumiseks on innatsükli luteaalfaasi keskjärg või 8.-12. (keskmiselt 10.) innatsükli päev. Follikulaarkasvu esilekutsumine munasarjades, alates teisest või kolmandast ovulatsioonijärgsest päevast, on võimalik, kuid ovulatsioonide arv on kaks korda ja embrüote arv kuni kolm korda väiksem, võrreldes superovulatsiooni esilekutsumisega alates innatsükli keskjärgust (Chupin *et al.*, 1984; Boland *et al.*, 1991). Põhjuseks on suurem arv keskmise suurusega folliikuleid munasarjades 8.-10. innatsüklipäeval, mis on võimelised adekvaatselt reageerima stimuleerimisele (Foot, Ellington, 1988).

Tänapäeval kasutatakse superovulatsiooni esilekutsumiseks peamiselt sea hüpofüsaarse folliikuleid stimuleeriva hormooni (*follicle stimulating hormone*, FSH-P) ekstrakti preparaate. Neid preparaate süstitakse doonoritele 4 või 5 päeva jooksul, kaks korda päevas, kas võrdsetes või alanevates doosides (üldine doos on 40-50 mg). FSH-P preparaadid, sarnaselt tiine mära seerumile (*pregnant mare serum*, TMS), sisaldavad mõlemaid hormoone, nii FSH-d kui ka luteiniseerivat hormooni (*luteinizing hormone*, LH). Superovulatoorne reaktsioon follikulaarkasvu hormonaalsele stimuleerimisele munasarjades sõltub FSH ja LH kogustest

kasutatavas preparaadis ja nende omavahelisest suhtest (FSH : LH). Superovulatsiooni esilekutsumiseks LH kogus peab olema FSH-P preparaadis 15 ja 20% vahel. Kõrge LH sisaldus gonadotroopses preparaadis avaldab negatiivset toimet mitte ainult superovulatoorse reaktsiooni suurusele, vaid ka vähendab viljastunud munarakkude arvu. Madala LH sisaldusega preparaatide kasutamisel tõuseb siirdamiskõlblike embrüote kvaliteet (Donaldson, Ward, 1985; Donaldson, Ward, 1986). Vähesel määral kasutatakse superovulatsiooni indutseerimiseks ka hobuste (De Loos *et al.*, 1991) ja inimeste (Rajamahendran, Calder, 1993) kooriongonadotropiini preparaate. Kooriongonadotropiinide kasutamisel esineb doonorloomadel rohkem häireid follikulaararengus ja ootsüüde valmimisel, võrreldes FSH-P preparaatidega (Foot, Ellington, 1988; Murphy, Martinuk, 1991; Laurincik *et al.*, 1993).

### **5.3. Hormoonide seos superovulatoorse reaktsiooniga**

Superovulatsiooni ja morfoloogiliselt kvaliteetsete, siirdamiseks kõlblike embrüote saamist doonoritelt võib mõjutada follikulaarkasvu hormonaalne stimuleerimine ise (nii FSH-P kui ka TMS-i preparaatide kasutamisel). Nende gonadotropiinide kasutamisel toimuvad endokriinsed muutused, mis võivad väljenduda munarakkude enneaegses valmimises ja ovuleerumises ning süsteemsete hormoonide profiilide muutumises (Foot, Ellington, 1988). Selle üheks põhjuseks on progesteroonisisalduse järsk tõus gonadotropiinide manustamise järel, mis võib olla isegi kuni kaks korda kõrgem, võrreldes selle hormooni sisaldusega mittestimuleeritud loomadel (Dieleman, Bevers, 1993; Solti *et al.*, 1996). Hormonaalselt töödeldud doonorloomadel mitteametilisest preovulatoorsetest folliikulitest 65% sisaldasid estradiooli vahetult enne superovulatsiooni neli korda rohkem, võrreldes mittestimuleeritud loomadega (Dieleman, Bevers, 1993).

Progesteron ja estradiool mõjutavad ootsüüdi liikumist munajuhas (Crisman *et al.*, 1980), spermide pääsemist munajuhasse (Hunter, Wilmut, 1984), munajuha sekretsiooni (Wegner, Killian, 1992) ja munajuhalehtri kontraktiilsust (Friedman *et al.*, 1994). Muutunud perioovulatoorse progesterooni, estradiooli ja luteiniseeriva hormooni produktsioon assotsieerus mõnedel stimuleeritud loomadel ebanormaalsete muutustega, kolmandikul munarakkudest nende valmimisel, viljastamisel ning embrüote arengu ajal (De Loos *et al.*, 1991; Hyttel *et al.*, 1991; Bousquet *et al.*, 1995). Folliikulite selektsioon ja kasv, mis kestab tavaliselt ligi 61 tundi, lüheneb superovuleeritud doonoritel kolmandiku võrra ja kestab 41 tundi. Superovulatoorse reaktsiooni puhul võib ind kesta 24-36 tundi ning esimese ja viimase ovulatsiooni vahe võib olla

kuni 56 tundi (Becze *et al.*, 1979). Superovulatoorse perioodi pikkus on keskmiselt 8,3 (vahemik 4-12) tundi, kusjuures ligi 75% ovulatsioonidest toimub esimese 4 tunni jooksul (Laurincik *et al.*, 1993; Purwantara *et al.*, 1994).

Munasarjade reaktsioon folliikulaarkasvu hormonaalsele stimuleerimisele on seotud progesterooni ja estradioli sekretsiooniga ja omavahelise toimega doonorloomadel (Saumande, Chupin, 1986; Herrler *et al.*, 1990), mida kinnitavad uurimisandmed progesterooni- ja estradiolisisalduste kohta piimas (Herrler, Niemann, 1989; Herrler *et al.*, 1990) ja vereplasmas (Mehmood *et al.*, 1991). Teistes uuringutes progesteroonisisaldused (Nancarrow, Miller, 1975; Sreenan, Gosling, 1977) ei korreleerunud superovulatsiooni indutseerimise algpäeval järgneva munasarjade reaktsiooniga. Vastupidine arvamus on see, et doonorite endokriinse profiili uurimine enne hormonaalset töötlemist võimaldab prognoosida superovulatoorset reaktsiooni, kuid ainult kliiniliselt tervetel lehmadel.

Üheks probleemiks, mis on täheldatud mõnedel superovuleeritud doonoritel, on preovulatoorse LH sekretsiooni tõusu puudumine. Muutused endokriinses süsteemis võivad tekkida ka kollakeha taandarengu ajal või pärast LH sekretsiooni allasurumist FSH poolt, loomade töötlemise ajal ning liiga lühikese ajavahemiku tõttu prostaglandiini süstimise ja LH tõusu vahel (Greve *et al.*, 1995; Roberge *et al.*, 1995). Superovulatsiooni esilekutsumisel eriti kõrge LH sisaldusega preparaatidega, üksikud suured folliikulid, kui teised folliikulid vajavad veel ovuleerumiseks veel kasvuaega. Enneaegse ovulatsiooni tulemusena, mis tekib 13%-l superovuleerunud doonoritest, ei allu varakult moodustunud kollakehad hiljem prostaglandiin  $F_2\alpha$  toimele ning põhjustavad progesteroonisisalduse tõusu doonorite seemenduse ajal (Callesen *et al.*, 1987), see omakorda pärsib ovulatsioonieelset luteiniseeriva hormooni sekretsiooni tõusu (Foot, Ellington, 1988).

Progesterooni määramine superovulatsiooni alustamisel (keskmiselt 10. innatsükli päev) on tähtis seetõttu, et selleks ajaks on kollakeha juba formeerunud, mis kindlustab munasarjades üheaegset folliikulite arengut. Callesen *et al.* (1988) leidsid, et nendelt doonoritelt, kellel oli superovulatsiooni esilekutsumisel madal progesteroonisisaldus vereplasmas (alla 1,0 ng/ml), ei saadud suurt arvu kõrgekvaliteetseid embrüoid. Aktiivse kollakeha esinemine, mida võib teha kindlaks progesteroonisisalduse järgi hormonaalanalüüsi abil nii folliikulaarkasvu stimuleerimise, kui ka prostaglandiin  $F_2\alpha$  manustamise ajal, on väga tähtis superovulatoorse reaktsiooni saamiseks (Kafi, McGovan, 1997). Gonadotroopsete preparaatide kasutamisel on märgatud progesteroonisisalduse tõusmist 24 tundi pärast superovulatsiooni esilekutsumise alustamist (Barnes *et al.*, 1982; McGovan *et al.*, 1985), kuid mitte alati (Gonzales *et al.*, 1990). Järelikult, kas progesterooni tõus gonadotroopsete hormoonide manustamise järel, mida võib

põhjustada nende luteotroopne toime, mõjutab superovulatsiooni suurust või mitte, jääb vaieldavaks ja seetõttu vajab uurimist.

Prostaglandiin  $F_2\alpha$  süstimise järel toimub järsk progesteroonisisalduse langus veres kollakeha kiire taandarengu tõttu. Nendel gonadotropiiniga stimuleeritud loomadel, kellel esines kõrge progesteroonisisaldus seemenduse ajal (üle 1,0 ng/ml), saadi enamasti mitteviljastunud embrüoid (Mikel-Jensen *et al.*, 1982; Greve *et al.*, 1983), mida võivad põhjustada mitte täielikult regresseerunud kollakehad (Donaldson, 1984) või gonadotropiini manustamise alustamisel enneaegse ovulatsiooni järel formeerunud kollakehad, mis ei allunud prostaglandiin  $F_2\alpha$  toimele (Greve *et al.*, 1983; Callesen *et al.*, 1986). Greve *et al.* (1984) andmete järgi oli 39,5%-l superovulatsiooniks töödeldud loomadest progesteroonisisaldus ebanormaalne preovulatoorse perioodi ajal (alla 1,0 ng/ml) ja mõne päeva pärast (üle 1,0 ng/ml). Ebanormaalsete progesteroonisisalduste põhjuseks võib olla enneaegne ovulatsioon ja luteaalsüstide tekkimine. Kõrge progesteroonisisaldus mõjutab LH sekretsiooni, ovulatsioonide arvu, spermide transporti viljastamispaika ja viljastamisprotsessi (Kafi, McGovan, 1997). On leitud korrelatsioon kollakehade arvu ja progesteroonisisalduse vahel juba mõne tunni, kui ka 8 päeva möödumisel viimasest ovulatsioonist (Sreenan *et al.*, 1978; Saumande, 1980; Wubishet *et al.*, 1991).

Kirjandusandmetest selgub, et endokriinsete faktorite uurimine, mis mõjutavad folliikulite selektsiooni, kasvu ja taandarengu protsesse, on vajalikud superovulatsiooni esilekutsumise meetodite täiustamiseks. On neli tähtsat perioodi, millal määrata progesteroonisisaldust: esimene kui alustatakse folliikulaarkasvu hormonaalset stimuleerimist munasarjades, teine kollakeha taandarengu indutseerimine prostaglandiiniga  $F_2\alpha$ , kolmas inna ja seemenduse ajal, millal kollakeha peab olema täielikult taandarenenud ja neljas periood on enne embrüote väljaloputamist emakast, mis võib olla superovulatsiooni (mitmete kollakehade formeerumise) näitajaks. Seega, progesteroonisisaldust nendel perioodidel võiks kasutada superovulatoorse reaktsiooni prognoosimiseks ja hindamiseks.

## **6. UURIMUSTÖÖ EESMÄRK**

Uurimustöö eesmärgiks oli uurida piima progesteroonisisalduse dünaamikat ning selle seost superovulatoorse reaktsiooni suurusega embrüodoonorlehmadel. Lisaks uuriti superovulatoorse reaktsiooni suuruse prognoosimise võimalikkust piima progesteroonisisalduse alusel doonorite hormonaalse töötlemise perioodil.

## **7. MATERJAL JA METOODIKA**

### **7.1. Katseloomad ja uurimisperiood**

Antud uuringus kasutati embrüodoonorina 21 piimalehma, nendest 13 eesti holsteini tõugu, 6 eesti punast tõugu ja 2 eesti maakarja tõugu lehma. Doonorloomad pärinesid viiest piimafarmist. Katsed viidi läbi perioodil jaanuar 2010 kuni veebruar 2012.

Katsesse valmistati ette kaks või kolm doonorit. Tabelis 2 on näidatud loomade töötlemise skeem, piimaproovide kogumise ja munasarjade ultrasonograafilise uurimise päevad.

Tabel 2. Katseskeem embrüodonorite superovulatsiooni indutseerimiseks, piimaproovide kogumiseks ja ultrasonograafilise uuringu päevad

Embrüodonorite töötlemise periood	Preparaat	Piimaproov	Ultraheli
1. päev - Inna indutseerimine	PGF <sub>2</sub> α	X	X
2			
3		X	
4			
5			
6			
7			
8			
9			
10			
11			
12			
13		X	X
14. päev - Innatsükli sünkroniseerimine	PGF <sub>2</sub> α		
15			
16		X	X
17			
18		X	
19			
20		X	
21			
22		X	
23			
24		X	
25			
26. päev - Follikulaarkasvu stimuleerimine	FSH, 2 korda	X	
27. päev - Follikulaarkasvu stimuleerimine	FSH, 2 korda	X	
28. päev - Kollakeha regresseerimine	FSH + PGF <sub>2</sub> α, 2korda	X	
29. päev - Follikulaarkasvu stimuleerimine	FSH, 2 korda	X	
30. päev - Superovulatsioon	Seemendus, 2 korda	X	X
31			
32		X	
33			
34		X	
35			
36			
37. päev - Superovulatsiooni hindamine	Embrüote loputus	X	X

## 7.2. Embrüodonorite töötlemine superovulatsiooni esilekutsumiseks

Enne superovulatsiooni esilekutsumist, sünkroniseeriti doonoritel innatsükliid, süstides 2 korda 14-päevase intervalliga PGF<sub>2</sub>α (Dinolytic®, Pharmacia N.V/S.A., Puurs, Belgia). Superovulatsioon kutsuti esile kasutades FSH preparaati (Folltropiin®, Bioniche Teo Inverin,



Co. Galway, Dublin, Iirimaa). Alates 26. päevast (10. päev pärast doonorite indlemist) süstiti FSH-d kaks korda päevas, võrdsetes doosides (700 I.U lahustatud 20 ml lahuses), iga kord 2,5 ml, 12-tunniste intervallidega nelja päeva jooksul folliikulaarkasvu stimuleerimiseks. Kolmandal FSH-ga töötlemise päeval (28. päev) süstiti üheaegselt kaks korda  $\text{PGF}_2\alpha$  12 tunnise intervalliga, kollakeha taandarengu indutseerimiseks. Doonorid seemendati järgmisel päeval pärast FSH töötlemist (30. päev) kaks korda, 12-tunnise intervalliga. Superovulatoorse reaktsiooni suurust hinnati enne embrüote loputamist munasarjades formeerunud kollakehade arvu järgi rektaalse palpeerimise või ultrasonograafilise uurimise abil. Embrüote loputus teostati 7. päeval pärast seemendust (J. Kurõkin, A. Aljas) mittekirurgilisel meetodil, kasutades kahekanaliga embrüote loputuskateetrit (CH 18, Minitub, Saksamaa). Emakasarvede loputamiseks kasutati spetsiaalset loputuslahust (Recovery Medium, Minitube of America, Inc, Verona, WI, USA). Iga sarve jaoks kasutati 500 milliliitrit (ml) loputuslahust. Väljaloputatud embrüote ja munarakkude morfoloogiline kvaliteet, seisund ja arengujärk hinnati mikroskoopiliselt 100 kordse suurenduse all (prof. Ü. Jaakma, A. Aljas).

### **7.3. Piimaproovide kogumine ja progesterooni analüüs**

Piimaproovid (10-15 ml) koguti üks tund pärast lüpsi tuubidesse, mis sisaldasid konservanti kaalium dikromaat ja hoiti külmutatuna  $-18^\circ\text{C}$  juures kuni analüüsimiseni. Kokku koguti iga looma kohta 16 piimaproovi. Progesteroonisisaldus piimaproovides määrati Eestis väljatöötatud monoklonaalsel antikehal põhineva immunoensüümaatilise meetodi (Valdmann, 1999) abil (prof. A. Valdmann). Selle analüüsimismeetodi tundlikkuse limiit piimaproovi 20  $\mu\text{l}$ -s oli alla 0.5 ng/ml. Analüüsi sisese ja analüüsi vahelise variatsiooni koefitsiendid olid alla 10%.

#### **7.4. Ultrasonograafilised uuringud**

Töötlemise perioodil viidi läbi kuus ultrasonograafilist uuringut ühe looma kohta. Munasarjade uurimiseks kasutati ultraheliaparaati, mis oli varustatud rektaalseks uurimiseks ettenähtud anduriga, sagedusega 7,5 MHz (HS-1500V, Honda Electronics Co., Toyohashi City, Jaapan). Retrospektiivse analüüsi läbiviimiseks möödeti ning salvestati antud tulemused.

#### **7.5. Andmete statistiline analüüs**

Superovalatoorse reaktsiooni hindamise kriteeriumiks oli hormonaalse töötlemise järel munasarjades formeerunud kollakehade arv, mille alusel jaotati embrüodoonorid kahte gruppi: madala superovulatoorse reaktsiooniga grupp - kuni 6 kollaleha ja kõrge superovulatoorse reaktsiooniga grupp- 7 ja rohkem kollakeha doonori kohta. Seejärel võrreldi kahe grupi piima progesterooni kontsentratsioone kõigil kuuteistkümmel päeval, mil proovid olid võetud. Keskmiste piima progesterooni kontsentratsioonide ja superovulatoorse reaktsiooni omavaheliste seoste kindlakstegemiseks kasutati Spaermani mitteparameetrilist korrelatsiooni testi. Hindamaks superovulatoorse reaktsiooni klassifitseerimiseks optimaalseid piima progesteroonisisaldusi neljal olulisel päeval (26. päev, 28. päev, 30. päev, 37. päev) kasutati suhteliste töökarakteristikute kõvera analüüsi.

Gruppide keskmiste progesteroonisisalduste võrdluses reaktsiooni suuruse järgi gruppidesse jaotumisel, leiti statistiline olulisus, kasutades selleks Mann- Wihney testi.

## 8. TULEMUSED

Embrüodoonorite hormonaalse töötlemise järel leiti märkimisväärne erinevus superovulatoorse reaktsiooni suurusel doonorlehmadel. Kokku antud uuringuks kasutatud 21 lehmast 10 lehmale oli superovulatoorne reaktsioon madal, keskmiselt  $3,3 \pm 2,3$  kollakeha ja 11 lehmale tunduvat kõrgem, keskmiselt  $10,1 \pm 2,7$  kollakeha ühe doonori kohta.

Doonorite loputamisel saadi kokku 123 embrüot ja munarakku. Tabelis 3 toodud andmed näitavad, et madala superovulatoorse reaktsiooniga doonoritelt saadi keskmiselt ühe doonori kohta  $1,3 \pm 2,3$  embrüot ja munarakku, nendest  $0,6 \pm 1,3$  embrüot ja  $0,6 \pm 1,0$  viljastamata ja degenerereerunud munarakku. Kõrge superovulatoorse reaktsiooniga doonoritelt saadi keskmiselt ühe doonori kohta  $8,5 \pm 4,6$  embrüot ja munarakku, nendest  $4,0 \pm 1,9$  embrüot ja  $5,4 \pm 4,1$  viljastamata ja degenerereerunud munarakku.

Tabel 3. Embrüote ja munarakkude hulk madala ja kõrge superovulatoorse reaktsiooniga doonorlehmadel

Doonorite loputamise tulemused	Doonorlehmad	
	Madal reaktsioon	Kõrge reaktsioon
Embrüoid ja munarakke kokku, nendest:	$1,3 \pm 2,3$	$8,5 \pm 4,6$
Viljastunud munarakke	$0,6 \pm 1,3$	$4,0 \pm 1,9$
Viljastamata munarakke	$0,6 \pm 1,0$	$5,4 \pm 4,1$
Keskmine piimatoodang päevas ( kg )	$38,3 \pm 6,7$	$38,7 \pm 6,3$

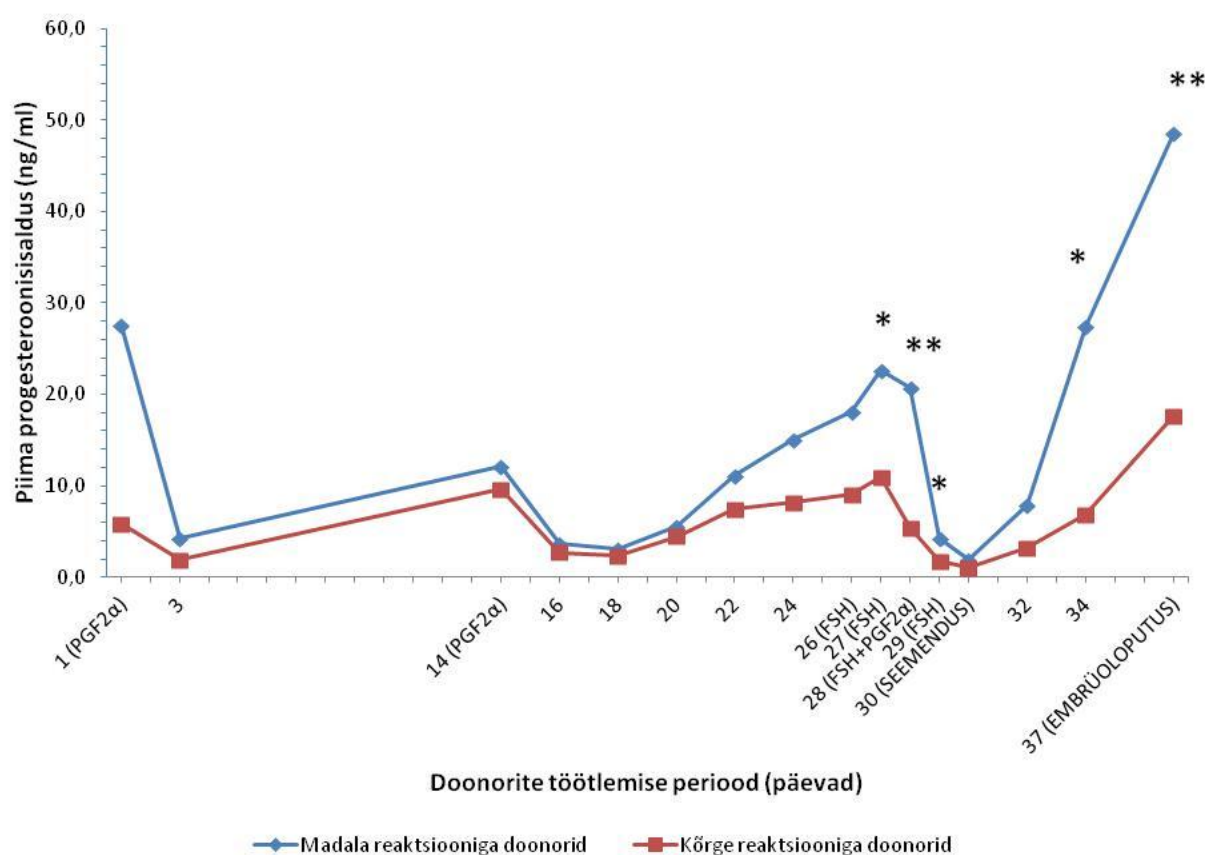
Piima progesterooni analüüs näitas (Tabel 4), et superovulatoorse töötlemise perioodil olid progesterooni kontsentratsioonid madala reaktsiooniga doonoritel tunduvalt madalamad kõikidel analüüsitud päevadel. Statistiliselt olulisteks olid päevad 27, 28, 29 ning 34 ja 37.

Tabel 4. Piima progesterooni muutused superovulatoorse töötlemise perioodil madala ja kõrge superovulatoorse reaktsiooniga embrüodonoritel

Töötlemise periood	Progesterooni kontsentratsioon (ng/ml)		P- väärtus
	Madal reaktsioon keskmine ± standardhälve (n = 10)	Kõrge reaktsioon keskmine ± standardhälve (n = 11)	Madal vs. kõrge reaktsioon
1. päev - PGF <sub>2</sub> α	5,9 ± 5,9	30,3 ± 26,5	0,123
3. päev	2,0 ± 2,5	4,7 ± 8,4	0,940
14. päev - PGF <sub>2</sub> α	9,7 ± 7,2	13,3 ± 9,5	0,500
16. päev	2,7 ± 3,4	3,6 ± 4,0	0,805
18. päev	2,4 ± 2,9	3,0 ± 3,0	0,438
20. päev	4,5 ± 4,8	5,6 ± 6,0	0,647
22. päev	7,5 ± 5,9	11,1 ± 12,7	0,751
24. päev	8,2 ± 6,7	15,1 ± 13,2	0,150
26. päev - FSH, 2 korda	9,1 ± 8,9	18,1 ± 13,4	0,073
27. päev - FSH, 2 korda	11,0 ± 11,7	22,6 ± 15,0	0,045
28. päev - FSH + PGF <sub>2</sub> α, 2 korda	5,5 ± 6,5	20,7 ± 16,8	0,007
29. päev - FSH, 2 korda	1,8 ± 2,5	4,2 ± 3,9	0,018
30. päev - Seemendus, 2 korda	1,1 ± 0,9	1,9 ± 1,2	0,091
32. päev	3,3 ± 4,7	7,9 ± 10,6	0,159
34. päev	6,9 ± 7,2	27,4 ± 22,0	0,015
37. päev Embrüote loputamine	17,6 ± 18,5	48,6 ± 19,3	0,005
Kollakehade arv	3,3 ± 2,3	10,1 ± 2,7	0,001

Väljatoodud piima progesterooni profiilid Joonisel 1 illustreerivad progesterooni dünaamikat doonorite töötlemise perioodi algusest kuni embrüote loputamiseni. Statistiliselt olulised erinevused progesteroonisisalduste vahel olid 27., 28. ja 29. ning 34. ja 37. päeval.

Piima progesterooni andmete statistilisest analüüsist selgus (Tabel 5), et superovulatoorse reaktsiooni prognoosimiseks optimaalsed progesteroonisisalduse kriteeriumid on 26. päeval (esimene FSH manustamine) 12,7 ng/ml, 28. päeval (PGF<sub>2</sub>α manustamine kollakeha taandarengu indutseerimiseks) 12,86 ng/ml, 30. päeval (doonorite seemendamine) 1,5 ng/ml ja 37. ehk embrüote loputamispäeval 23,5 ng/ml. Nendest kriteeriumitest madalam progesteroonisisaldus kas või ühel nendest päevadest viitab võimalusele, et superovulatoorne reaktsioon tuleb madal. Piima progesteroonisisaldus 28. ja 37. päeval võimaldas kõige täpsemalt prognoosida kõrget superovulatoorset reaktsiooni.



Joonis 1. Piima progesterooni dünaamika hormonaalse töötlemise perioodil kõrge ja madala superovulatoorse reaktsiooniga embrüodoonoritel. Tärnidega tähistatud päevadel erinesid piima progesteroonisisaldused grupiti oluliselt, \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ .

Tabel 5. Superovulatoorse reaktsiooni klassifitseerimise (madal või kõrge) optimaalsed piima progesteroonisisalduse kriteeriumid ning täpsus FSH ja PGF<sub>2α</sub> töötlemise päevadel

Statistiline näitaja	Superovulatoorse reaktsiooni prognoosimise päevad			
	26. päev (1. FHS)	28. päev (FSH + PGF <sub>2α</sub> )	30. päev (seemendus)	37. päev (embrüote loputus)
Optimaalne klassifitseerimise kriteerium (progesteron ng/ml)	12,70	12,86	1,51	23,51
ROC kõvera alune ala	0,736	0,855	0,723	0,864
Tundlikus (%)	72,73	63,64	63,64	90,91
Spetsiifilisus (%)	70,00	90,00	80,00	80,00
95% usaldusvahemik	0,501-0,902	0,633-0,968	0,487-0,0,893	0,644-0,972
P - väärtus	0,042	< 0,001	0,057	< 0,001

Spaermanni korrelatsioonitesti tulemusel selgus, et tugevalt korreleeruvad reaktsiooni suurusega 28. päeva (FSH+PGF<sub>2</sub>α) ning 37. päeva (embrüoloputus) progesterooni kontsentratsioonid. 28. päeva korrelatsiooni koefitsiendiks saadi 0,614 (p=0,0031) ning 37. päeva koefitsiendiks 0,637 (p=0,0019). Antud tulemused näitavad, et nende kahe päeva progesteroonisisaldused omavad tugevat seost reaktsiooni suurusega. Testi tulemusena selgus, et 26. päeva ning 30. päeva progesteroonisisaldused ei korreleeru statistiliselt usutavalt reaktsiooni suurusega. Korrelatsioonikoefitsientideks nendel päevadel: 26. päev 0,409 (p=0,0653) ning 30. päev 0,386 (p=0,0840).

## 9. ARUTELU

Suure hulga morfoloogiliselt kvaliteetsete, siirdamiseks kõlblike embrüote saamine doonorloomadelt on oluliseks faktoriks, mis mõjutab embrüosiirdamise tehnoloogia kasutamise efektiivsust. Embrüote saamiseks *in vivo* kasutatakse doonorite kombineeritud töötlemist gonadotroopsete hormoonide ja prostaglandiin  $F_2\alpha$  preparaatidega. Folliikulaarkasvu hormonaalse stimuleerimise abil kutsutakse esile doonorite munasarjades mitmete folliikulite kasv ja prostaglandiin  $F_2\alpha$  abil kollakeha taandareng, mille järel toimub munarakkude suhteliselt üheaegne valmimine ja vabanemine kasvanud folliikulitest, mida nimetakse superovulatsiooniks. Toimunud ovulatsioonide arv munasarjades ja vabanenud munarakkude hulk, mis arenevad seemenduse järel embrüo staadiumini ning seejärel loputatakse doonori emakast välja, on põhinäitajad, mis iseloomustavad superovulatsiooni esilekutsumise edukust. Meie uuringus saadi kõrge superovulatoorse reaktsiooniga doonoritelt keskmiselt ühe doonori kohta  $8,5 \pm 4,6$  embrüot ja munarakku, nendest  $4,0 \pm 1,9$  siirdamiseks sobivat embrüot, kuigi kirjanduse järgi saadakse keskmiselt 5-7 siirdamiseks sobivat embrüot (Callesen *et al.*, 1992; Lohuis *et al.*, 1993; Callesen *et al.*, 1994; McGuirk, 1995; Gordon, 1996; Peippo *et al.*, 2009).

Tänapäeval kasutatakse superovulatsiooni esilekutsumiseks peamiselt sea hüpofüsaarse follikuleid stimuleeriva hormooni (FSH-P) ekstrakti preparaate, mis meie uuringus indutseeris 21 embrüodoonorlehmast 10 doonoril madala reaktsiooni, keskmiselt 3,3 ja 11 lehmalt tunduvalt kõrgema reaktsiooni, keskmiselt 10,1 kollakeha ühe doonori kohta. Innatsükli kulu reguleerimisel on tähtis roll hormoonidel estradiol-17 $\beta$  ja progesteron. Normis on nendel loomadel, kes reageerisid hormonaalse mõjutamisele superovulatsiooniga, folliikulaarne estradiolisisaldus on väga kõrge ligi 15-17 tundi pärast LH tõusu ja progesteron on madal ja pärast hakkab prevaleerima progesteronisisaldus (Callesen *et al.*, 1986; Hyttel *et al.*, 1986). Becze *et al.* (1979) leidsid, et kui folliikulaarkasvu stimuleerimise alustamisel esines aktiivne kollakeha, oli superovulatoorne reaktsioon suur. Rida uuringuid kinnitavad superovulatsiooni indutseerimise alguspäeva piima progesteronisisalduse (Herrler, Niemann, 1989; Herrler *et al.*, 1990) ja vereplasma progesteronisisalduse (Mehmood *et al.*, 1991) seost järgneva munasarjade reaktsiooniga, kuid osades uuringutes ei leitud mingit korrelatsiooni progesteronisisalduste ja reaktsiooni suuruses (Nancarrow, Miller, 1975; Sreenan, Gosling, 1977). Vastupidine arvamus on see, et doonorite endokriinse profiili uurimine enne hormonaalset töötlemist siiski võib olla näitajaks superovulatoorse reaktsiooni toimumise prognoosimiseks, kuid ainult kliiniliselt tervetel lehmadel. Prognostilist väärtust ei oma endokriinse profiili uurimine mittelakteerivatel ja sigimishäiretega lehmadel (Desaulniers *et al.*, 1995). Meie uuringus leiti, et piima

progesteroonisisaldus kõrge superovulatoorse reaktsiooniga doonoritel ei erinenud statistiliselt progesterooni sisaldusest madala reaktsiooniga doonoritel follikulaarkasvu stimuleerimise algul.

Prostaglandiin  $F_2\alpha$  süstimise järel toimub järsk progesteroonisisalduse langus veres kollakeha kiire taandarengu tõttu. Normaalse innatsükli keskjärgus prostaglandiin  $F_2\alpha$  süstimise järel langeb progesteroonisisaldus vereseerumis juba 8 tunni pärast ligi kaks korda, 11-16 tunni pärast oli progesteroonisisaldus alla 1,0 ng/ml (Barnes *et al.*, 1982; Schallenberger *et al.*, 1984; Tian *et al.*, 1994). Muutused endokriinses süsteemis võivad tekkida ka kollakeha taandarengu ajal või pärast LH sekretsiooni allasurumist FSH poolt, loomade töötlemise ajal ning liiga lühikese ajavahemiku tõttu prostaglandiini süstimise ja LH tõusu vahel (Greve *et al.*, 1995; Roberge *et al.*, 1995). Kuigi gonadotroopsed preparaadid ise ei kutsu esile LH sekretsiooni allasurumist (Price, 1995), selle põhjuseks võib olla kõrge estradioolisisaldus veres, mida sekreteerivad suur arv kasvavaid folliikuleid ja mille tõttu toimub enneaegne üksikute folliikulite ovulatsioon, kui teised folliikulid vajavad veel kasvuaega. Enneaegse ovulatsiooni tulemusena ei allu varakult moodustunud kollakehad prostaglandiin  $F_2\alpha$  toimele ning põhjustavad progesteroonisisalduse tõusu doonorite seemenduse ajal (Callesen *et al.*, 1987), mida ei ole märgata madala reaktsiooniga doonoritel meie uuringus.

Superoovulatsioon on iseloomustuv mitmete kollakehade formeerumisega munasarjades ning on märgatud tihedat korrelatsiooni kollakehade arvu ja progesteroonisisalduse vahel juba nii mõne tunni, kui ka 8 päeva möödumisel viimasest ovulatsioonist (Sreenan *et al.*, 1978; Saumande, 1980; Wubishet *et al.*, 1991), mida kinnitavad meie poolt saadud uurimisandmed. Meie uuringu tulemustest selgus, et 28. ja 37. päeva progesteroonisisalduste alusel on võimalik prognoosida superovulatsiooni esinemist (tabel 5).



## 10. JÄRELDUSED

Antud uurimistöö tulemusena selgus, et doonorloomade munasarjade superovulatoorse reaktsiooni suurust on võimalik ette prognoosida, kasutades selleks piima progesteroonisisalduse määramist. Kõige paremini aitab ennustada reaktsiooni suurust doonorite töötlemisperioodi 28. päev, mil manustatakse loomadele FSH ja PGF<sub>2</sub> $\alpha$  preparaate. Lähtuvalt katsetulemustest, võib väita, et ka saadud embrüote ning munarakkude hulk on suurem doonoritel, kelle progesteroonisisaldus oli antud päeval kõrgem. Lähtuvalt sellest, saaks tulevikus embrüosiirdamisel sperma valikul just neid andmeid kasutada, kuna kõrgekvaliteetne ning hea aretusväärtusega spermat ei tasuks raisata doonoritele, kellel prognoosi kohaselt jääb reaktsioon madalaks.

## 11. KASUTATUD KIRJANDUS

- Barnes, M. A., Martinez-Castellano, A., Kasmer, G. W., Wade, R. J., Halman, R. D. Effect of exogenous FSH on oestrous, ovulation and endogenous hormone release in dairy cows. *Theriogenology* 1982;18:311-323.
- Beckers, J. F., Drion, P. V., Figueiredo, J. R., Goffin, L., Ectors, F. J. The ovarian follicle in cow: In vivo growth and in vitro culture. *Reprod Dom Anim* 1966;31:543-548.
- Becze, J., Meszaros, J., Perjes, I. Untersuchungen zur Verbesserung des Superovulationserfolges bei Kühen. *Zuchthygiene* 1979;14:26-30.
- Bindon, B. M., Piper, L. P., Cahill, L. P., Driancourt, M. A., O'Shea, T. Genetic and hormonal factors affecting superovulation. *Theriogenology* 1986;25:53-70.
- Boland, M. P., Goulding, D., Roche, J. F. Alternative gonadotrophins for superovulation in cattle. *Theriogenology* 1991;35:5-17.
- Bousquet, D., Milovanov, C., Bell, J.C., Durocher, J., Smith, L. C. Nuclear and cytoplasmic maturation of oocytes aspirated from large follicles in superovulated heifers. *Theriogenology* 1995;43:172 (abstr.).
- Callesen, H., Greve, T., Hyttel, P. Premature ovulation in superovulated cattle. *Theriogenology* 1987;28:155-166.
- Callesen, H., Greve, T., Hyttel, P. Preovulatory evaluation of the superovulatory response in donor cattle. *Theriogenology* 1988;30:477-488.
- Callesen, H., Bak, A., Greve, T. Embryotechnology in dairy cattle breeding. *Trends in Research and Applications*. Portland Press, London and Chapel Hill, 1992;207-214.
- Chebel, R. C., Demetrio, D. G. B., Metzger, J. Factors affecting success of embryo collection and transfer in large dairy herds. *Theriogenology*, 2008. 69; 98-106
- Christie, W. B., McGuirk, B. J., Strachie, R. J., Mullan, J. S. Practical experience with the implementation of a MOET breeding scheme with dairy cattle. *Ann Zootech* 1992; 41:347-352.
- Chupin, D., Combarous, Y., Procureur, R. Antagonistic effect of LH on FSH induced superovulation in cattle. *Theriogenology* 1984;21:229 (abstr.).
- Crisman, R. O., McDonald, L. E., Thompson, F. N. Effects of progesterone or estradiol on uterine tubal transport of ova in the cow. *Theriogenology* 1980;13:141-154.
- De Feu, Patton, Evans, Lonergan, Butler. The effect of strain of Holstein-Friesian cow size of ovarian structures, periovulatory circulating steroid concentrations, and embryo quality following superovulation. *Theriogenology*, 2008; 70; 1101-1110.

De Loos, F. A. M., Bevers, M. M., Dieleman, S. J., Kruip, T. A. M. Follicular and oocyte maturation in cows treated for superovulation. *Theriogenology* 1991;35:537-546.

Dieleman, S. J., Bevers, M. M. Folliculogenesis and oocyte maturation on superovulated cattle. *Mol Reprod and Devel* 1993;36:271-273.

Dieleman, S. J., Bevers, M. M., Vos, P. L. A. M., de Loos, F. A. M. PMSG/anti- PMSG in cattle: a simple and efficient superovulatory treatment. *Theriogenology* 1993;39:25-41.

Donaldson, L. E. Dose of FSH-P as a source of variation in embryo production from superovulated cows. *Theriogenology* 1984 ;21:205-212.

Donaldson, L. E. Effect of age donor cows on embryo production. *Theriogenology* 1984; 21:963-967.

Donaldson, L. E. Cattle breed as a source of variation in embryo transfer. *Theriogenology* 1984; 21:1012-1018.

Donaldson, L. E. The day of estrous cycle that FSH is started and superovulation in cattle. *Theriogenology* 1984; 22:97-99.

Donaldson, L. E. Ward DN. Superovulation in cattle. Dose response to SFH-W with or without LH contamination. *Theriogenology* 1985;23:189.

Donaldson, L. E. Ward DN. Effects of luteinising hormone on embryo production in superovulated cows. *Vet Rec* 1986;119:625-626.

Erickson, B. H. Development and radio-response of the prenatal bovine ovary. *J Repro Fert* 1966; 10:97-105.

Erickson, B.H. Development and senescence of postnatal bovine ovary. *J Anim Sci* 1966; 25:800-805.

Foot, R. H., Ellington, J. E. Is a superovulated oocyte normal? *Theriogenology* 1988;29:111-123.

Friedman, R., Lais, T., Weber, D.W, Stormshak F. Responses of the bovine infundibulum to nonadrenaline during the estrous cycle. *J Reprod Fertil* 1994;101:311-315.

Gonzalez, A., Lussier, J. G., Carruthers, T. D, Murphy, B. D., Mapletoft, R. J. Superovulation of beef heifers with follitrophin: a new FSH preparation containing LH activity. *Theriogenology* 1990;33:519-529.

Gordon, I. Controlled reproduction in Cattle and Buffaloes. *Embryo Transfer and Associated techniques in Cattle*. Cambridge, 1996,431.

Greve, T., Callesen, H., Hyttel, P. Endocrine profile and egg quality in the superovulated cows. *Nord Vet Med* 1983;35:408-421.

Greve, T., Callesen, H., Hyttel P. Plasma progesterone profiles and embryo quality in superovulated dairy cows. *Theriogenology* 1984;21:238.

Greve, T., Callesen, H., Hyttel, P., Hoier, R., Assey, R. The effects of exogenous gonadotropins on oocyte and embryo quality in cattle. *Theriogenology* 1995;43:41-50.

Guilbault, L. A., Lussier, J. G., Grasso, F., Matton, P., Rouillier, P. Follicular dynamics and superovulation in cattle. *Can Vet* 1991; 32:91-93.

Guilbault, L. A., Lussier, J. G., Grasso, F., Rouillier, P., Matton, P. Decreased superovulatory responses in heifers superovulated in the presens of a dominant follicle. *J Reprod Fertil* 1991; 91: 81-89.

Hayakawa, H., Hirai, T., Takimoto, A., Ideta, A., Aoyagi, Y. Superovulation and embryo transfer in Holstein cattle using sexed sperm. *Theriogenology* 2009; 71; 68-73

Henriquez, M. M., Gurolla, D. I., Gamboa, V. J., Estrada, B.E., Garcia, D. B. Superovulatory response in New Zealand Holstein cows stimulated with Menopausal gonadotrophins in North-Western Mexico. *The 13th Int Cong Anim Reprod, Sidney, Australia* 1996;2:4-28.

Herrler, A., Niemann, H. Rapid milk progesterone assay as a tool for screening of potential donor cows prior to superovulation. *Theriogenology*1989;31:203 (abstr.).

Herrler, A., Elsaesser, F., Niemann, H. Rapid milk progesterone assay as a tool for the selection of potential donor cows prior to superovulation. *Theriogenology* 1990;33: 415-422.

Hockley, D. K., Bo, G. A., Palasz, A. T., Del Campo, M. R., Mapletoft, R. J. Superovulation with a single subcutaneous injection of Folltropin in the cow: effect of dose and site of injection. *Theriogenology* 1992;37:224 (abstr.).

Hunter, R. H. F., Wilmut, I. Sperm transport in the cow: Perioovulatory redistribution of viable cells within the oviduct. *Rep Nutr Dev* 1984;24:597-608.

Hyttel, P., Callesen, H., Greve, T., Schmidt, M. Oocyte maturation and sperm transport in superovulated cattle. *Theriogenology* 1991;35:91-108.

Kafi, M., McGovan, M. R. Factors associated with variation in the superovulatory response of cattle. *Anim Reprod Sci* 1997;48:137-157.

Kasiray, R., Mutha Rao, M., Rangareddi, N.S., Misra, A. K. Superovulatory response in Buffaloes following single subcutaneous or multiple intramuscular FSH administration. *Theriogenology* 1992;37:234 (abstr.).

Lange, H. Embryotransfer bei der OHG 1993/94. *Osnabrücker Schwartzbuntzucht* 1995;69:37-38.

Laurincik, J., Oberfranc, M., Hyttel, P., Grafenau, P., Tomanek, M., Pivko, J. Characterization of the ovulatory period in superovilated heifers. *Theriogenology* 1993a;39:537-544.

Laurincik, J., Grafenau, P., Hyttel, P., Greve, T. Character of preovulatory follicles and oocytes after different superovulatory treatments in heifers. *Theriogenology* 1993b;39:545-551.

Lussier, J. G., Carruthers, T. D. Endocrine and superovulatory responses in heifers pretreated with FSH or bivariate follicular fluid. *Theriogenology* 1989;31:779-794.

McGovan, M. R., Braithwaite, M., Johle, W., Mapletoft, R. J. Superovulation of beef heifers with Pergonal (HMG): a dose response trial. *Theriogenology* 1985; 24:173-184.

McGuirk, B. J. Experiences with a MOET breeding programme. *European Holst Fries Conf, Peebles, UK* 1995; 9.

Murphy, B. D., Martinuk, S. D. Equine chorionic gonadotrophin. *Endoc Rev* 1991;12:27-44 .

Mehmood, A., Anwar, M., Ullah, N., Baig, S. M., Wright, R. W. Jr. Pattern of sex steroid secretion and their relationship with embryo yield in Jersey cows superovulated with PMSG. *Theriogenology* 1991;35:513-520.

Mikel-Jensen, A., Greve, T., Madej, A., Edqvist, L. E. Endocrine profiles and embryo quality in the PMSG-PGF<sub>2</sub> $\alpha$  treated cow. *Theriogenology* 1982;18:33-44.

Nancarrow, C. D., Miller, W. J. B. Factors influencing oestrus synchronization relative to superovulation and egg transfer. *Proc E.E.C, seminar, Egg Transfer in Cattle. Cambridge,1977;291-300.*

Peippo, J., Vartia, K., Kananen-Anttila, K., Rätty, M., Korhonen, K., Hurme, T., Myllymäki, H., Sairanen, A., Mäki-Tanila, A. Embryo production from superovulated Holstein-Friesian dairy heifers and cows after insemination with frozen-thawed sex-sorted X spermatozoa or unsorted semen. *Anim Reprod Sci*, 2009, 111, 80–92.

Purwantara, B., Callesen, H., Greve, T. Characteristics of ovulations in superovulated cattle. *Anim Reprod Sci* 1994;37:1-5.

Rajamahendran, R., Canesco, R. S., Denbow, C. J. Effect of low dose of FSH given at the beginning of the estrous cycle and subsequent superovulatory response in Holstein cows. *Theriogenology* 1987;28:59-65.

Rajamahendran, R., Calder, M. D. Superovulatory responses in dairy cow following ovulation of the dominant follicle of the first wave. *Theriogenology* 1993;40:99-109.

Roberge, S., Rieger, D., Rawlings, N. C. Periovarian LH, FSH and steroid hormone profiles in superovulated and unstimulated Holstein heifers. *Theriogenology* 1995;44:59-70.

Saumande, J. Concentration of luteinising hormone, estradiol-17 $\beta$  and progesterone in the plasma of heifers treated to induce superovulation. *J Endocr* 1980;84:425-437.

Schillo, K. K. Effects of dietary energy on control of luteinising hormone secretion in cattle and sheep. *J Anim Sci* 1992;70:1271-1282.

Silva, J. C., Lopes da Costa, L., Silva, J. R. Embryo yield and plasma progesterone profiles in superovulated dairy cows and heifers. *Animal Reproduction Science* 2002. 69; 1-8

Solti L, Huszenicza G, Cseh S, Kulcsar M, Szollar L, Fekete S, Abavary-Mihaly K, Seregi J. Plasma progesterone and lipid profiles in superovulated heifers. *Theriogenology* 1996;1:328 (abstr.).

Sreenan, M. J., Gosling, J.P. The effect of cycle stage and plasma progesterone level on the induction of multiple ovulations in heifers. *J Reprod Fert* 1977;50:367-369.

Synder, D. A. Superovulation of cows and heifers selected for twinning. *Theriogenology* 1986;25:200 (abstr.).

Waldmann, A., Monoclonal antibodies to progesterone: Characterization and selection for enzyme immunoassay in bovine milk. *Hybridoma* 1999; 18;3; 289-296

Wegner CC, Killian GJ. Origin of estrous-associated glycoproteins in bovine oviductal fluid. *J Reprod Fertil* 1992;95:841-854.

Wubishet, A., Kesler, D. J., Graves, C. N., Spahr, S. L., Favero, R. J. Preovulatory LH profiles of superovulated cows and P4 concentration at embryo recovery. *Theriogenology* 1991;35:451-457.

Yamamoto, M., Ooe, M., Kawaguchi, M., Suzuki, T. Superovulation in the cow with a single intramuscular injection of FSH dissolved in polyvinylpyrrolidone. *Theriogenology* 1994;41:747-755.

## **12. TÄNUAVALDUSED**

Eriliselt suur tänu minu juhendajatele Jevgeni Kurõkinile ja Andres Valdmannile

Lisaks sooviksin tänada alljärgnevat inimesi, kes on aidanud kaasa minu töö valmimisele:

Ülle Jaakma, Toomas Orro, Anne Tiidla, Liisa Kail

Ja suured tänud ka farmeritele, kelle loomad osalesid uuringus:

Andre Talu

Eerika Farm OÜ

Eesti Maaülikooli suurloomakliinik

Kesa Agro OÜ

Tartu Agro AS

Ühinenud Farmid AS