



EIT Food SUDAPS

**Warsztaty dla hodowców
bydła i producentów mleka**

Online: **3-4 grudnia**



Food

Regional
Innovation
Scheme



This activity has received funding from the European Institute of Innovation and Technology (EIT), a body of the European Union, under the Horizon 2020, the EU Framework Programme for Research and Innovation

**Fizjologia rozrodu bydła mlecznego i nowoczesne
metody sterowania rozrodem w stadzie**

dr n. wet. Paweł Kordowiczki, Dipl. ECAR



Podział

- 1) Dojrzewanie płciowe
- 2) Fizjologia cyklu rujowego
- 3) Programy hormonalne u bydła mlecznego
- 4) Nowoczesne biotechnologie w rozrodzie



Dojrzewanie płciowe

Jałówki przed dojrzałością płciową nie wykazują powtarzających się objawów cyklu rujowego/okresu aktywności seksualnej. Okres, w którym samica staje się dojrzała płciowo i jest w fizjologicznie w stanie się rozmnażać, jest nazywany dojrzewania.

Wiek osiągnięcia dojrzałości płciowej u bydła nie jest równoznaczny z dojrzałością hodowlaną.

Species	Puberty Age Ranges (Months)		Breeding Age Ranges (Months)	
	Males	Females	Males	Females
Cattle	6 - 20	4 - 14	18 - 24	15 - 24



Faktory wpływające na rozpoczęcie dojrzewania to:

A. Kondycja (przyrostyienne i waga ciała), rasa

B. Status hormonalny,

Zmiany zachodzące w okresie dojrzewania zależą bezpośrednio od aktywności jajników, które pełnią **dwie funkcje**: produkcję żeńskich gamet i synteza hormonów.

Początek dojrzewania i występowanie pierwszego cyklu rujowego zależy od wydzielania **estradiolu** w jajnikach w takim stopniu, aby jego stężenie w krążeniu było na tyle wysokie by stymulować wydzielanie przedowulacyjnego GnRH który wpływa na wzrost LH.

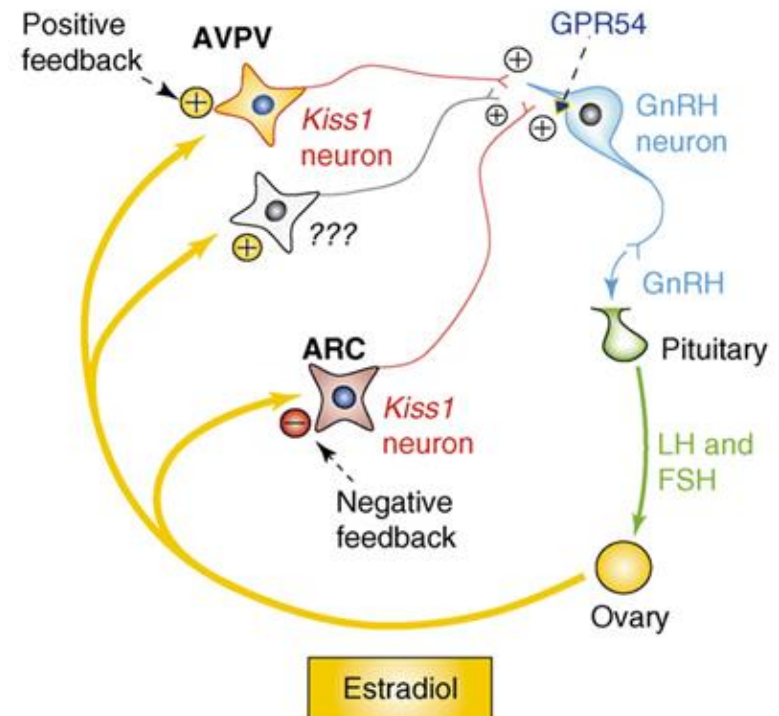


Kondycja jako faktor wpływający na rozpoczęcie dojrzewania:

- U większości ras bydła początek dojrzewania jest ściśle związane z osiągnięciem pewnej wagi ciała, a także z osiągnięciem pewnego procentu tkanki tłuszczowej.
- Zwierzęta które są dobrze żywione, mają odpowiednie przyrostyienne i osiągają dojrzałość płciową wcześniej.
- **Leptyna** wydzielana przez komórki tkanki tłuszczowej (adipocyty) odgrywa rolę w procesie dojrzewania płciowego.
- Leptyna działa jako „brama” metaboliczna wspierająca proces dojrzewania, i uważa się, że leptyna ma wpływ pośredni na neurony kisspeptyny

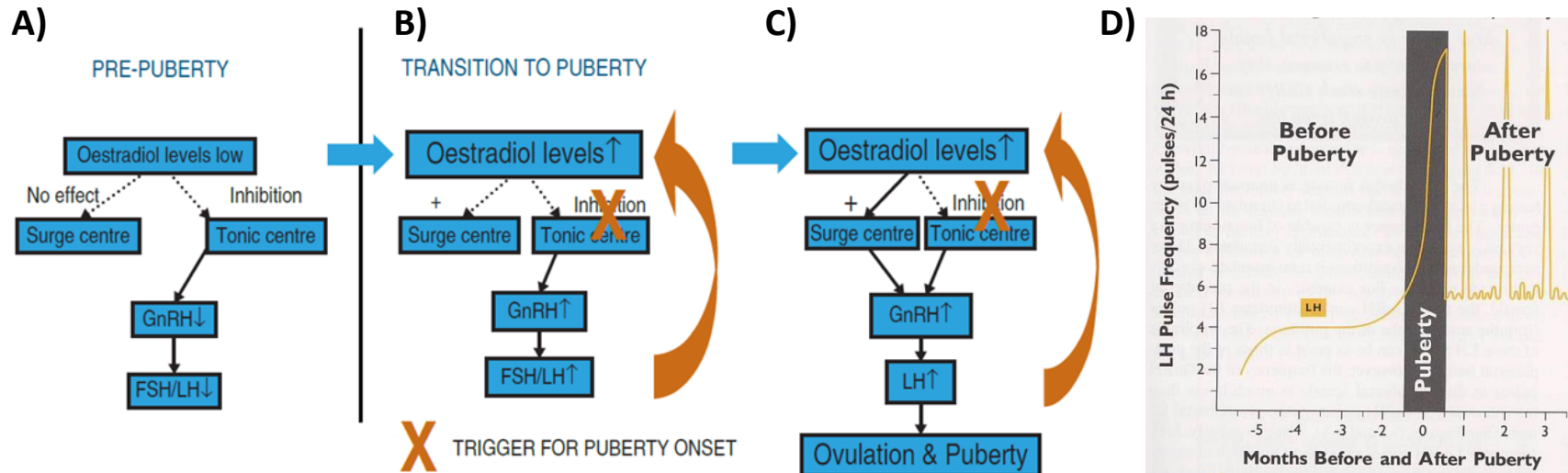
Kisspeptyna jako faktor wpływający na rozpoczęcie dojrzewania

- Istnieją obecnie znaczne dowody, że szlak sygnalizacyjny kisspeptyny jest warunkiem wstępnym do dojrzewania u ssaków, co doprowadziło do wyrażenia „puberty starts with a kiss- dojrzewanie zaczyna się od pocałunku ”





Estradiol jako faktor wpływający na rozpoczęcie dojrzewania



- A) Jajnik nie wydziela **wystarczającej ilości estradiolu** w celu stymulowania centrum podwzgórza odpowiedzialne za wytworzenia epizodów **GnRH o wysokiej amplitudzie**. Takie niskie stężenia estradiolu mają również negatywny wpływ na podwzgórze
- B) W okresie przejściowym do okresu dojrzewania, **wrażliwość ośrodka tonicznego na inhibicję estradiolu zmniejsza się**, umożliwiając neuronom podwzgórza wydzielanie GnRH. W konsekwencji częstotliwość epizodów LH i FSH wzrasta, co stymuluje jajnika do produkcji większej ilości estradiolu.
- C) Gdy **stężenie estradiolu osiąga wartość progową**, wtedy występuje wydzielanie przedowulacyjnego GnRH, co powoduje **przedowulacyjny wzrost LH**, owulację i rozpoczęcie dojrzewania D).



Rasa jako faktor wpływający na wiek dojrzewania

<u>Species</u>	<u>Average Age at Puberty (Months)</u>	
	<u>Female</u>	<u>Male</u>
<u>Cattle</u>		
Holstein	8	9
Brown Swiss	12	9
Angus	12	10
Hereford	13	11
Brahman	19	17



Fazy cyklu rujowego

Tradycyjnie cykl rujowy dzieli się na następujące fazy:

1. **Proestrus**- Jest to faza bezpośrednio poprzedzająca rui. Charakteryzuje się przez znaczny wzrost aktywności układu rozrodczego.
2. **Oestrus**- To jest okres akceptacji drugiego osobnika.
3. **Metoestrus**- To faza następująca po rui.
4. **Diestrus**- To jest okres ciała żółtego (corpus luteum/CL). CL jest w pełni funkcjonalny podczas tej fazy i wydziela duże ilości progesteronu.
5. **Anoestrus**- Jest to okres odpoczynku aktywności seksualnej



Cykl rujowy

- Istnieje precyzyjna wymiana między jajnikiem a podwzgórzem i przysadka mózgowa, ponieważ przedni płat przysadki ma nie tylko bezpośredni wpływ na czynność jajników (np. stymulowanie dojrzewania pęcherzyków, owulacja i tworzenie CL), ale jajnik ma również wpływ na podwzgórze i na przedni płat przysadki.
- Jest to głównie pośredniczone przez estradiol, wytwarzany przez pęcherzyki jajnikowe i progesteron wytwarzany przez CL. Na uwalnianie GnRH z podwzgórza negatywny efekt zwrotny ma estradiol i progesteron.
- Cykl rujowy jest podzielony na fazę folikularną (okres przed owulacją i krótko po owulacji) i fazę lutealną (okres po owulacji z aktywnym CL)

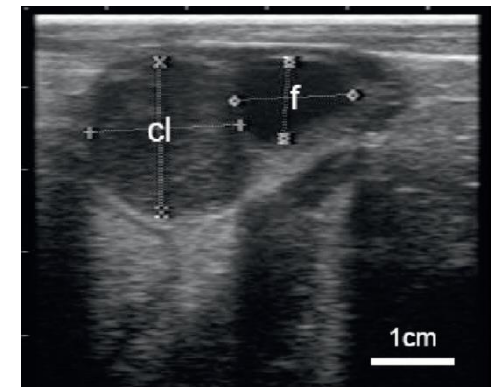
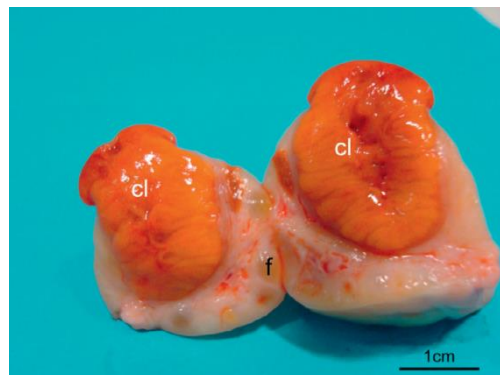
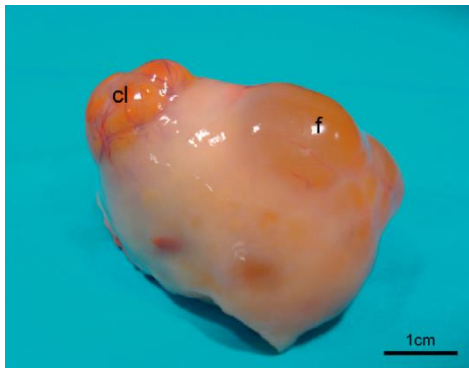


Cykl rujowy- owulacja

- Przedowulacyjny wzrost LH wywołuje zmiany w pęcherzyku Graafa, które kończą się owulacją.
- Owulacja jest złożonym procesem obejmującym przekształcenia pęcherzyka umożliwiające uwolnienie oocytu i konwersję pęcherzyka do CL.
- Wymienia się trzy kluczowe zdarzenia związane z owulacją:
- (1) podwyższony miejscowy przepływ krwi (przekrwienie) przez prostaglandynę E2 i VEGF;
- (2) rozpad tkanki łącznej w ścianie pęcherzyka owulacyjnego przez enzymy proteolityczne (np. kolagenazy, plazminy), lokalny wzrost produkcji progesteronu i PGE2 w warstwie theca
- (3) skurcze mięśni gładkich w obrębie warstw zewnętrznych pęcherzyka.

Cykl rujowy- tworzenie ciała żółtego (CL)

- CL powstaje z pęcherzyka Graafa po owulacji, przede wszystkim przez luteinizację komórek ziarnistych i komórek warstwy theca
- towarzyszy temu intensywna angiogeneza
- W pełni utworzony CL składa się z wiele różnych typów komórek: duże i małe komórki lutealne, fibroblasty, komórki mięśni gładkich, pericyty i komórki śródbłónka





Cykl rujowy- luteoliza

- **Luteoliza** lub **regresja ciątka żółtego** to proces prowadzący do zakończenia syntezy steroidów przez ciątko żółte i do zaniku funkcji lutealnej.
- Główną rolę w luteolizie odgrywa **PGF2 α** pochodząca z endometrium, która jest transportowana bezpośrednio z macicy do jajnika.
- **Oksytocyna** wydzielana przez CL stymuluje wydzielanie PGF2 α . Regresja lutealna ma dwa ważne elementy: (1) funkcjonalna regresja, w której zmniejsza się wydzielanie progesteronu; oraz (2) regresja strukturalna, w której występuje fizyczna inwolucja CL i regresja tkanki lutealnej



Cykl rujowy- fazy dojrzewania pęcherzyków jajnikowych

Poniższa terminologia oznacza poszczególne fazy dojrzewania pęcherzyków jajnikowych:

Rekrutacja: stymulacja przez gonadotropiny w grupie szybko rosnących pęcherzyków antralnych

Selekcja: proces, w którym jeden lub więcej rekrutowanych pęcherzyków jest/są wybierany/e w celu dalszego rozwoju

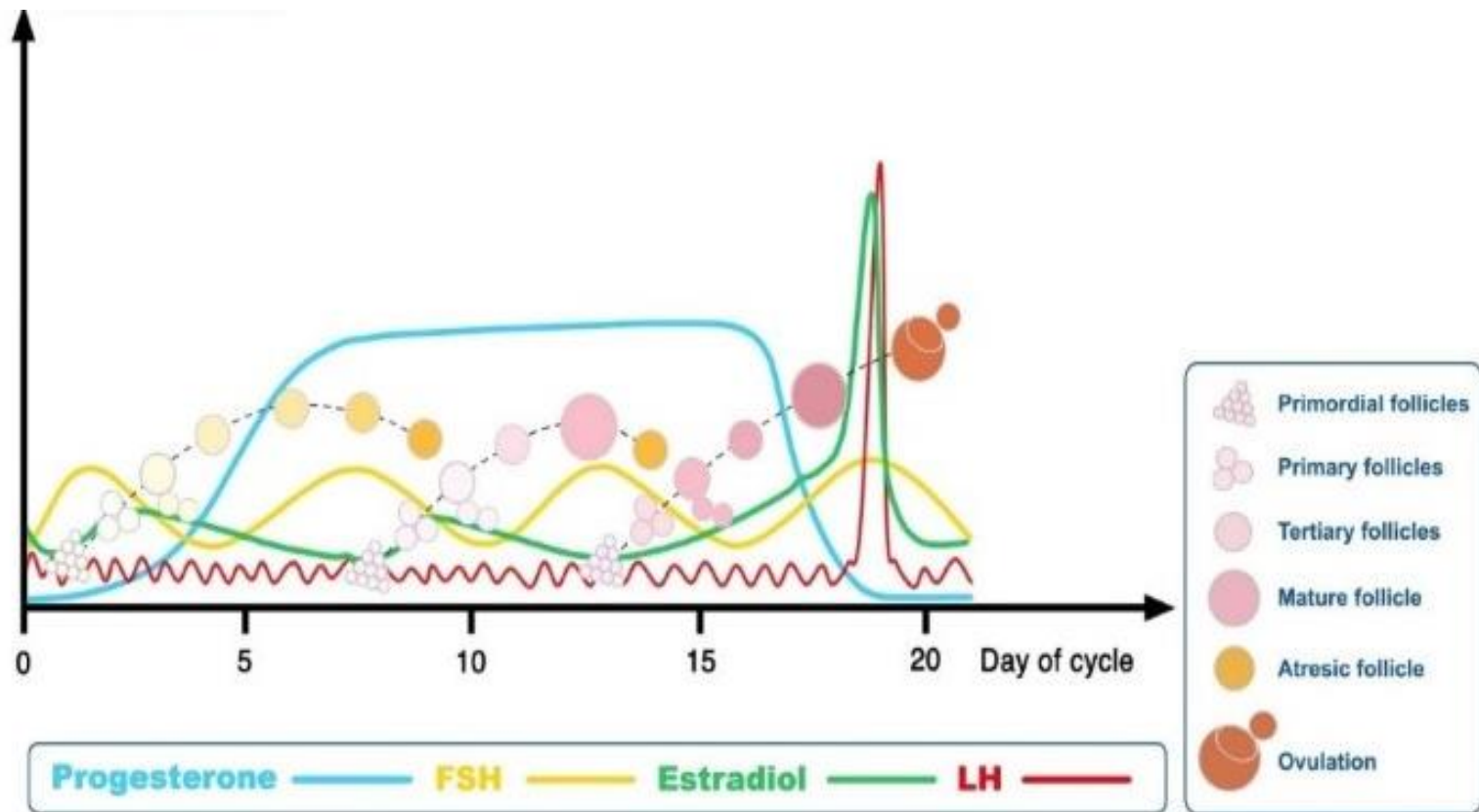
Dominacja: mechanizm, dzięki któremu jeden (dominujący pęcherzyk) lub kilka współistniejących pęcherzyków ulega dalszemu dojrzewaniu

Atrezja: Proces obumieranie pęcherzyków jajnikowych



Cykl rujowy- fale dojrzewania pęcherzyków jajnikowych

Wzór dynamiki pęcherzyków u gatunków przeżuwaczy (3 fale rekrutacji):



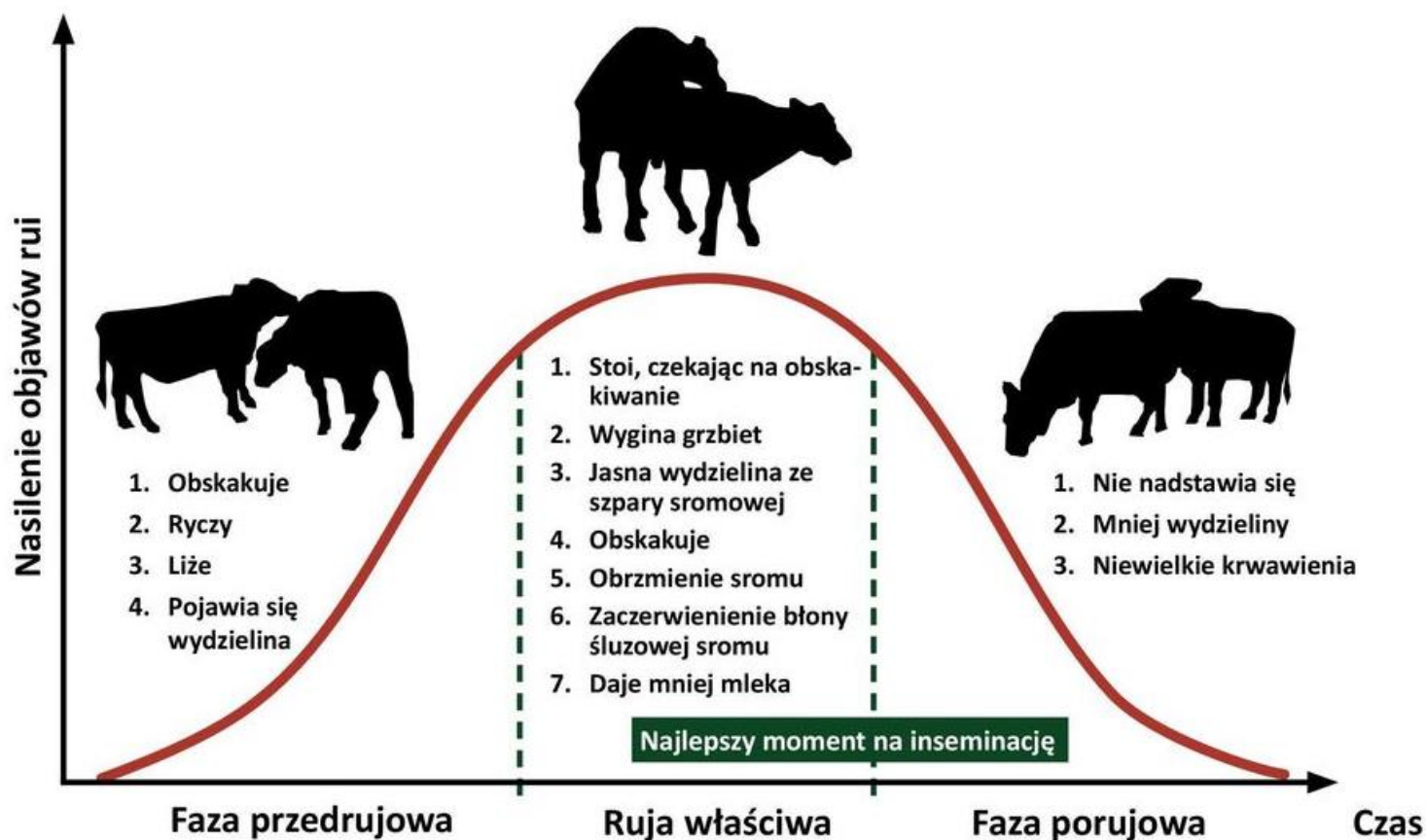


Cykl rujowy u krowy

- Średnia długość cyklu rujowego wynosi 20 dni (zakres 18–22 dni) u jałówek i 21 dni (zakres 18–24 dni) u krów.
- Długość rui właściwej, w której krowa akceptuje krycie wynosi około 15 godzin (z szerokim zakresem od 2 do 30 godzin).
- Optymalny czas dla inseminacji jest ok. 12 godzin po obserwacji pierwszych objawów rujowych.
- Natomiast owulacja występująca ok. 28 do 30 godzin po rozpoczęciu rui (lub ok. 12–18 godzin po zakończeniu rui)
- kryterium wizualnym, że krowa lub jałówka jest w rui, jest to, że samica stoi w momencie gdy jest imitowany akt krycia przez inne samice



Cykl rujowy u krowy





Programy hormonalne u bydła mlecznego: **Estrogeny**

Egzogenne estrogeny mają wpływać na cykliczną **aktywność jajników**. Były zarówno syntetyczne, jak i naturalne estrogeny stosowane u wielu gatunków. Jednak zwłaszcza gdy jest używany samodzielnie, główne skutki egzogennych estrogenów to zmiany w macicy / jajowodzie oraz w zachowaniu seksualnym.

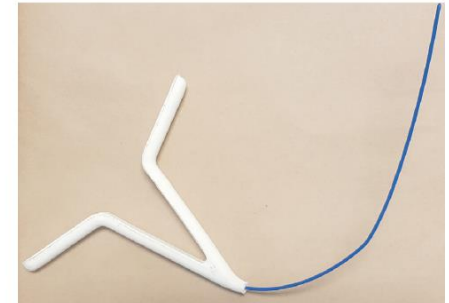
Jednak estrogeny są obecnie tylko dopuszczone do użytku w USA i Kanadzie i są powszechnie używane do synchronizacji rui w wielu krajach Ameryki Południowej.

Programy hormonalne u bydła mlecznego: Progestageny

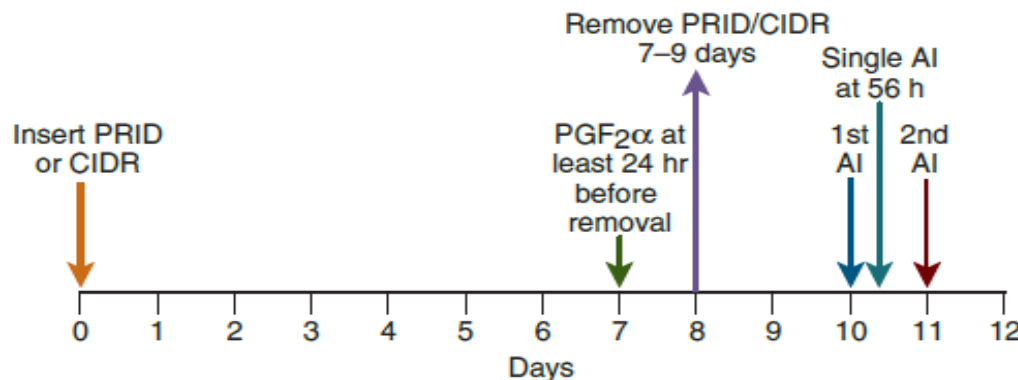
Progestageny używa się szczególnie w celu zsynchronizowania rui. Zasada stosowania egzogennych progestagenów polega na tym, że „naśladują” funkcję CL; tj. produkują negatywny wpływ na przedni płat przysadki mózgowej, który tłumi cykliczną aktywność hamowanie uwalniania gonadotropin.

Jednak zdecydowanie najpowszechniejszym zastosowaniem jest **synchronizacja grupy krów i jałówek** do inseminacji, bez konieczności długich okresów wykrywania rui.

Progesteron obecnie stosuje się jako wkładki dopochwowe. Sposób do leczenie anoestrus.



• Fig. 8.2 Controlled internal drug release (CIDR) device for use in cattle.

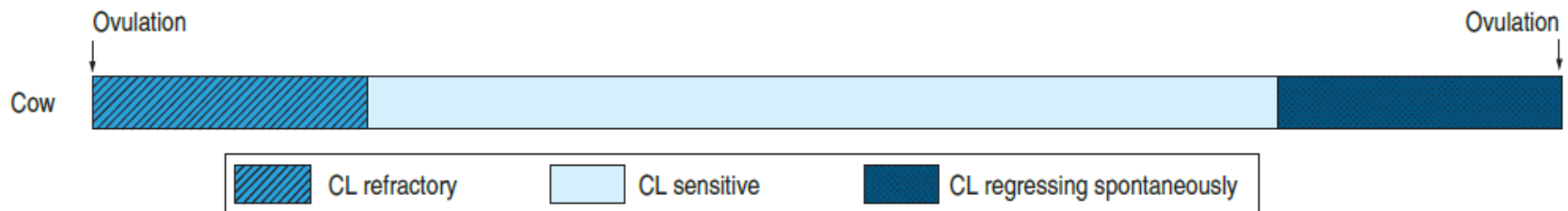


• Fig. 8.1 Progesterone-releasing intravaginal device (PRID) for use in cattle.



Programy hormonalne u bydła mlecznego: Prostaglandyny

Jeśli wykrywanie rui jest możliwe, wówczas można podać grupie krów z wrażliwym CL, wtedy nastąpi ruja za ok. 2 do 7 dni po iniekcji PGF_{2α} (większość po 3–5 dniach) i można inseminować.



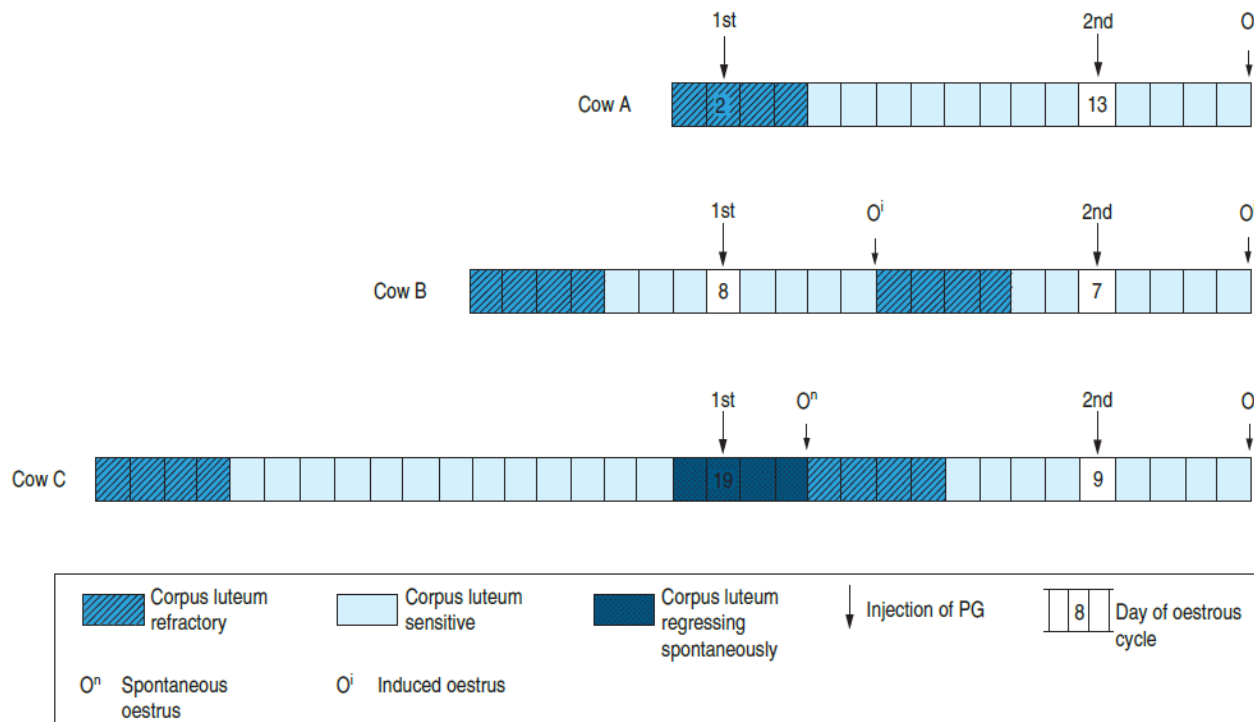
• **Fig. 8.6** Sensitivity of the corpus luteum (CL) of different species to PGF_{2α} during the oestrous cycle.

Tym krowom, u których się nie obserwuje rui, można ponownie podać PGF_{2α} ok. 11 do 14 dni później.



Programy hormonalne u bydła mlecznego: Prostaglandyny

Schematy podania egzogennej prostaglandyny:

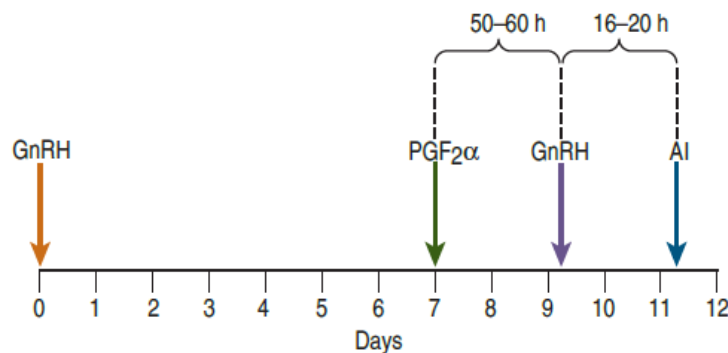


• **Fig. 8.7** Synchronization of oestrus in cows by the administration of two injections of PGF_{2α} or an analogue at an 11-day interval.

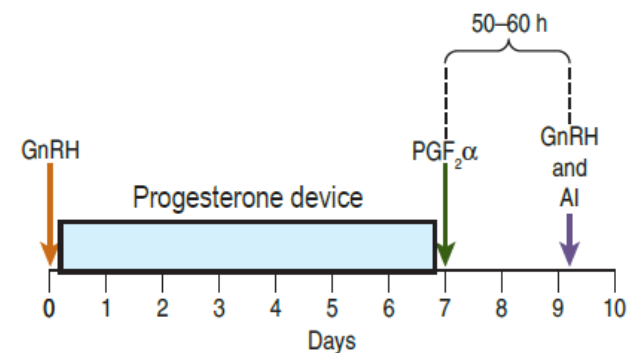
Programy hormonalne u bydła mlecznego: GnRH/OvSynch

Program **Ovsynch** według literatury jest najczęściej stosowany program do synchronizacji krów i jałówek, oraz w leczeniu anestrus (kombinowany z PRID).

Stosowanie eCG w tym samym czasie co PGF_{2α} stymuluje wzrost dominującego pęcherzyka. Ten efekt okazał się korzystny na odsetek zacielen.



• **Fig. 8.8** Protocol used for oestrus-synchronization in cows using a combination of GnRH and Prostaglandin F_{2α} followed by a single fixed-time AI (Ovsynch programme).



• **Fig. 8.9** Protocol used for oestrus-synchronization in the heifer using a PRID or CIDR together with a combination of GnRH and Prostaglandin F_{2α} followed by a single fixed-time AI.

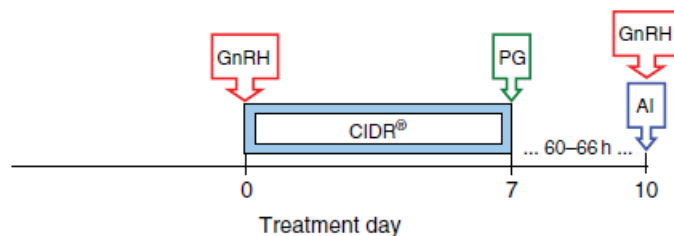


Programy hormonalne: Modyfikacje OvSynch

FIXED-TIME AI (TAI)*

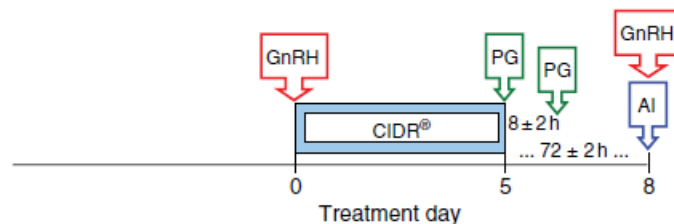
7-day CO-Synch + CIDR®

Perform TAI at 60 to 66 h after PG with GnRH at TAI.



5-day CO-Synch + CIDR®

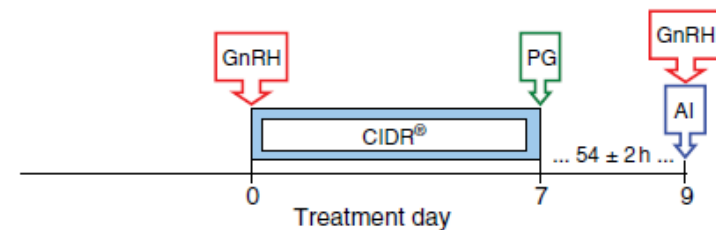
Perform TAI at 72 ± 2 h after CIDR removal with GnRH at TAI.
Two injections of PG 8 ± 2 h apart are required for this protocol.



FIXED-TIME AI (TAI)*

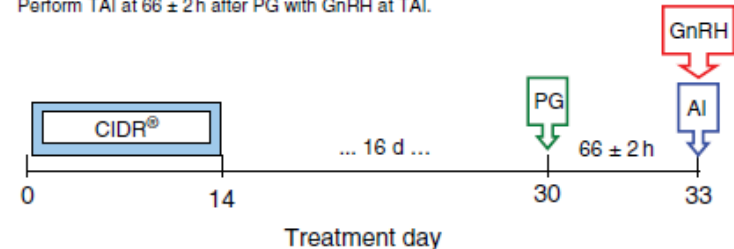
7-day CO-Synch + CIDR®

Perform TAI at 54 ± 2 h after PG with GnRH at TAI.



14-day CIDR®-PG

Perform TAI at 66 ± 2 h after PG with GnRH at TAI.





Nowoczesne biotechnologie w rozrodzie

Biotechnologia rozrodu to pojęcie, które określa szereg nienaturalnych metod rozrodu ssaków opracowanych z wykorzystaniem takich nauk jak: fizjologia, embriologia, kriobiologia gamet.

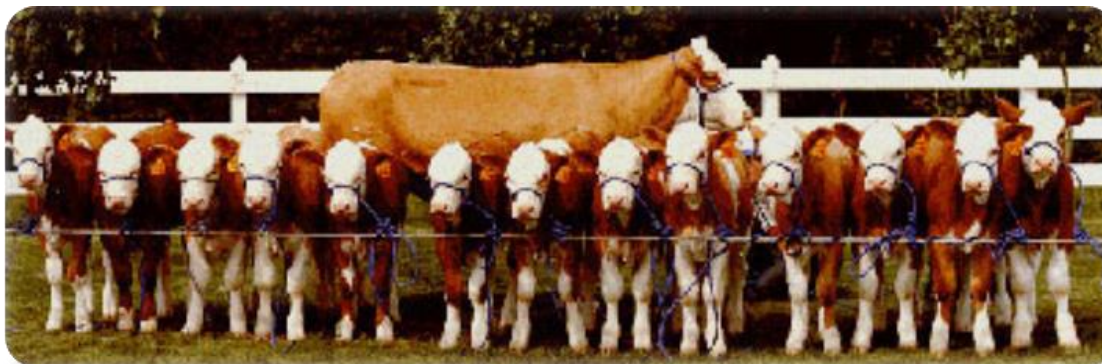
Metody biotechnologiczne związane z rozrodem samic (krów):

superowulacja, pozyskiwanie i przenoszenie zarodków (embriotransfer), pozyskiwanie komórek jajowych (ovum pick-up/OPU), kriokonserwacja oocytów i zarodków, oznaczanie płci zarodków, klonowanie, transgeneza.



Nowoczesne biotechnologie w rozrodzie: **Embriotransfer (ET)**

- Selekcja i synchronizacja rui dawczyń i biorczyń
- Superowulacja u dawczyń
- Inseminacja dawczyni
- Pozyskiwanie zarodka od dawczyni
- Ocena zarodków
- Przygotowanie biorczyń i transfer zarodków lub kriokonserwacja zarodków





Embriotransfer -Selekcja dawczyń

Idealna dawczyni (donor):

- Krowa o wysokiej wartości hodowlanej (wysoka wydajność mleczna/mięsna, dobry pokrój, prawidłowa budowa wymienia, matki buhajków)
- Krowa o regularnych i wyraźnych rujach, z **prawidłowo rozwiniętym układem rozrodczym** pomiędzy 3. a 10. rokiem życia, najlepiej po minimum jednym wycieleniu (zwraca się także uwagę na przebieg przebytej ciąży i porodu), szczepiona zgodnie z wymogami, u której **wykluczono choroby zakaźne.**





Embriotransfer -Selekcja dawczyń

Idealna dawczyni (donor):

Krowa z prawidłowo rozwiniętym układem rozrodczym

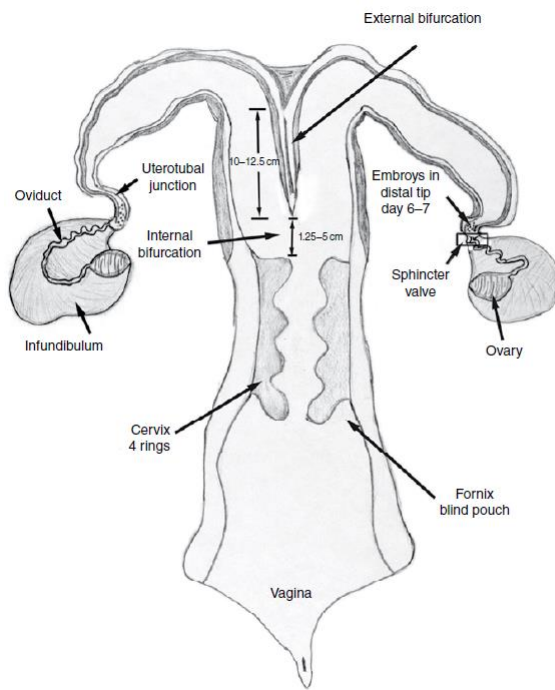


Figure 76.13 Y-shaped cervix (one external os, but a separate opening to each uterine horn).

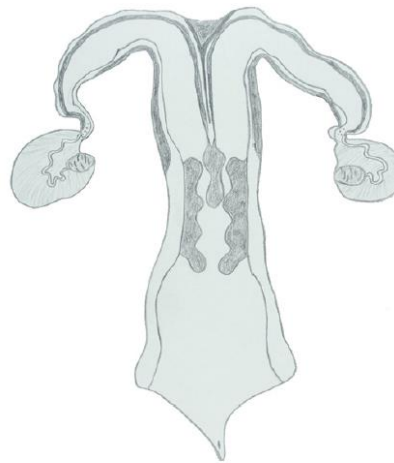
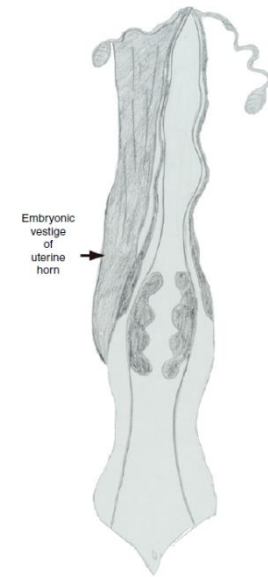
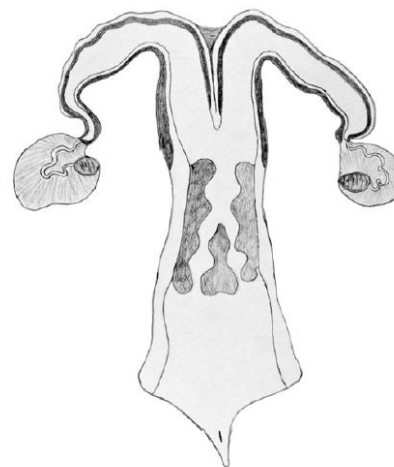


Figure 76.14 Inverted Y cervix (two external os, but only one internal os).



76.12 Uterus unicornis (segmental aplasia of the uterine horn).



Embriotransfer -Selekcja biorczyń

Idealna biorczyni (recipient/foster mother):

- **zdrowy układ rozrodczy i układ ruchu, aby zmniejszyć ryzyko zagrożenia ciąży i komplikacji przy porodzie**
- Wykazujące „łatwość wycieleń”
- W dobrej kondycji: BCS (Body Condition Scoring)
3-4 u krów mlecznych
- Dobra reakcja na synchronizację rui,
wyraźne CL, najlepiej pomiar P4

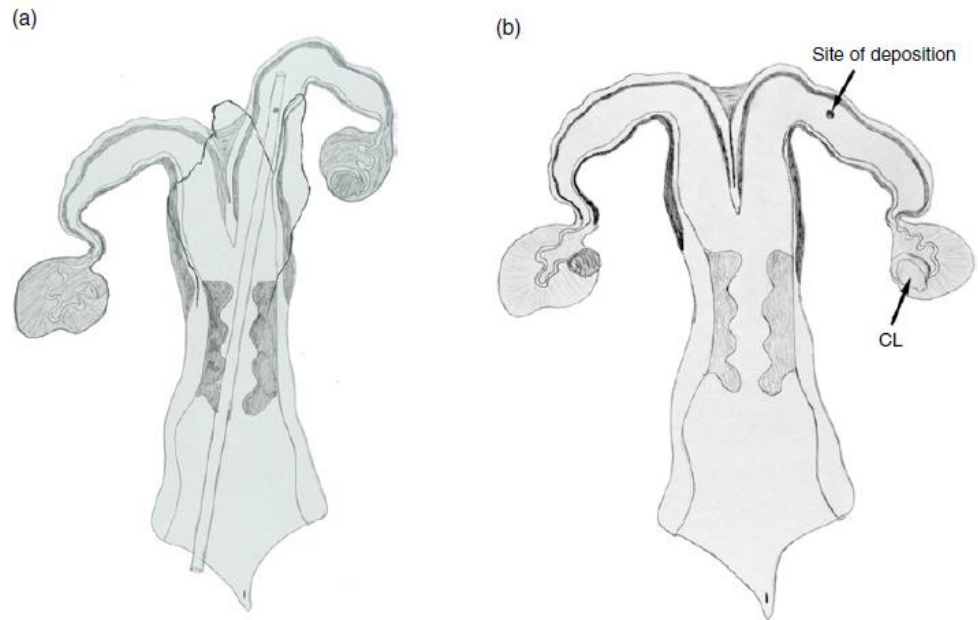


Figure 76.17 Site of embryo deposition. CL, corpus luteum.



Embriotransfer –wyposażenie do embriotransferu

Metoda bezkrwawa przez szyjkę macicy, termin płukania zardoków 7/8 d.p.i.

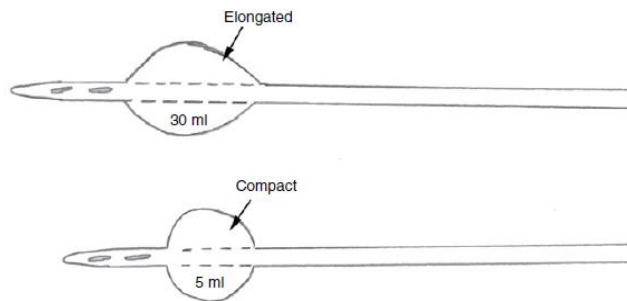


Figure 76.1 Shapes of Foley catheter balloon when inflated.

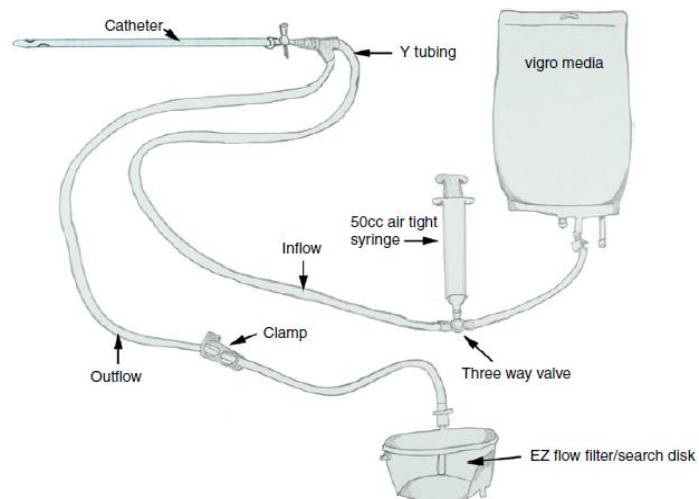


Figure 76.2 Schematic of flush equipment set-up.



Figure 76.10 Search bowls safely held in fast food containers and covered with Solo™ cup lids.



Embriotransfer – lokalizacja zarodków/pozycja balonika

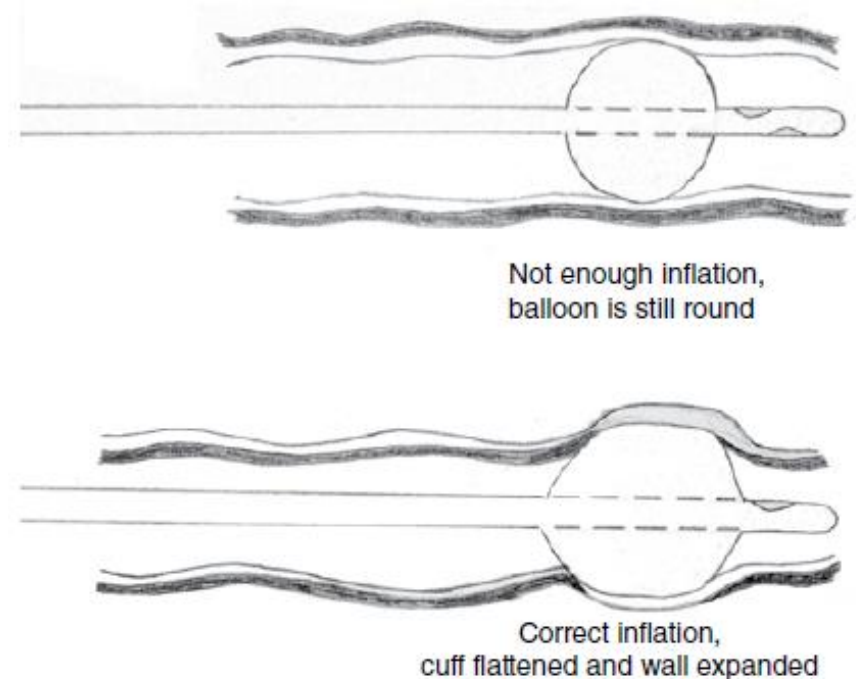
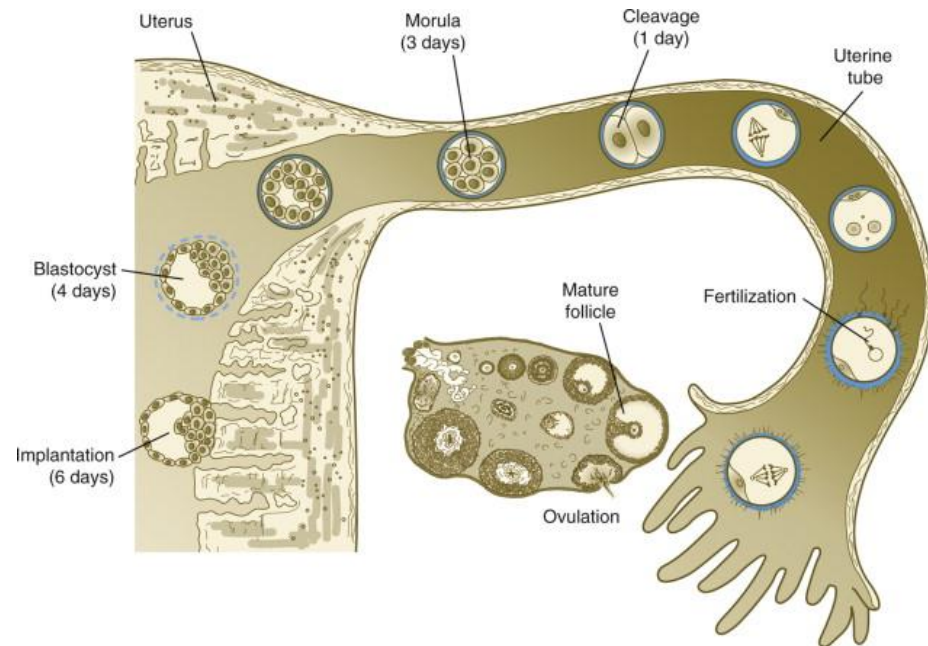


Figure 76.11 Proper position and inflation for "horn" flush.



Embriotransfer –Superowulacja

- wiele owulacji (Multiple Ovulations) przez aplikację eksog. hormonów (gonadotropin)
- Dojrzewanie oocytów i owulacji dodatkowych, a tym samym bardziej efektywne wykorzystanie komórek jajowych
- Zwiększenie rozwoju i redukcji atrezji pęcherzyków przez podawanie hormonów
- **PMSG/eCG**: z surowicy klaczy, FSH i LH podobny efekt , pojedyncze podawanie, długi okres półtrwania, ewentualnie podawanie Anti PMSG po inseminacji
- **FSH** : krótki okres półtrwania , codzienne podawanie (co 12h), ekstrakt z przysadki świni (rekombinowany)
- **HMG**: Ekstrakt z moczu kobiet , krótki okres półtrwania , FSH i LH podobne działanie , podawanie przez 4-5 dni , bardzo drogie



Embriotransfer –Schematy Superowulacji

ok. 3 Inseminacje co 12godz. Pierwsza inseminacja 14. dnia cyklu (dzień 0 dla zarodka)

Zyklustag	eCG (2000-3000 IU)	FSH (20-40mg)	HMG (1200-1500 IU)
0		BRUNST	
9		FSH 12stdl.	HMG 12stdl.
10	eCG	FSH 12stdl.	HMG 12stdl.
11		FSH 12stdl.+PG	HMG 12stdl.+PG
12	PG	FSH 12stdl.	HMG 12stdl.
13			
14		BESAMUNGEN 12stdl.	
21		SPÜLUNG	



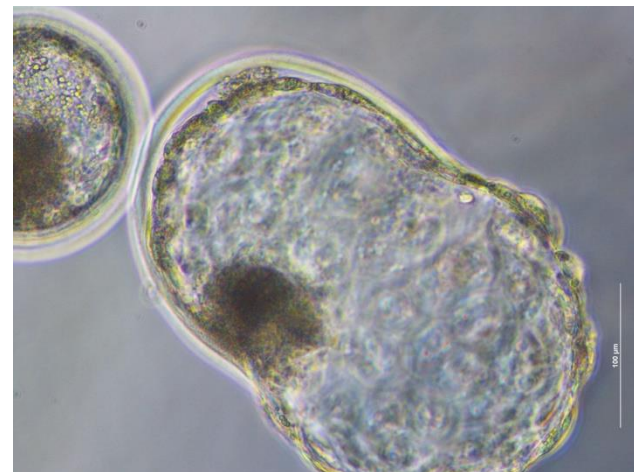
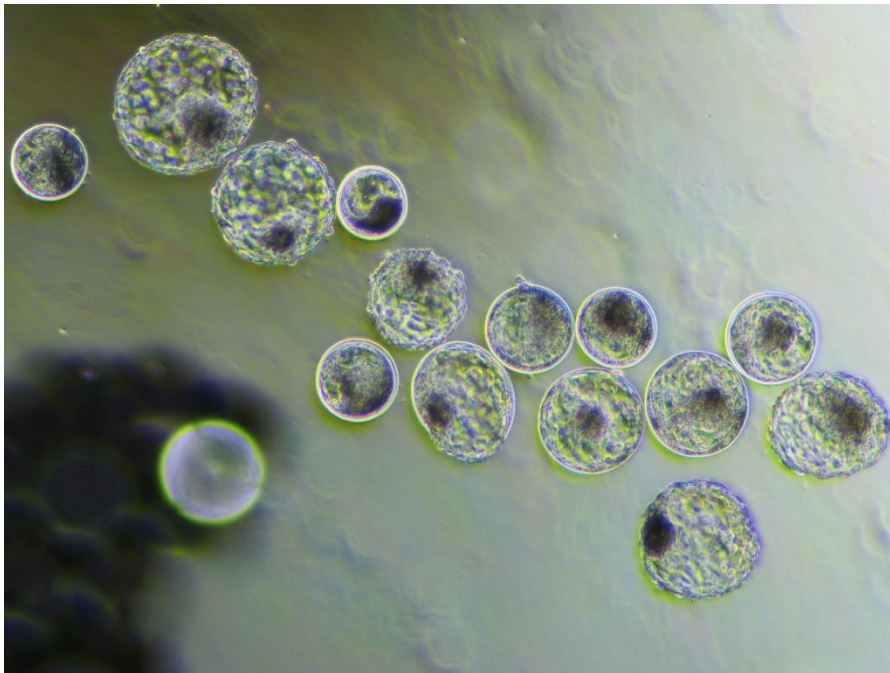
Embriotransfer –jajniki po superowulacji





Embriotransfer –ocena zarodków

- Wymagane są zarodki o wysokim potencjale rozwoju
- Sedymentacja lub filtracja płynu zawierającego zarodki
- Przeniesienie pozostałości osadu lub filtra na płytki Petriego
- ocena mikroskopowa





Embriotransfer –ocena zarodków

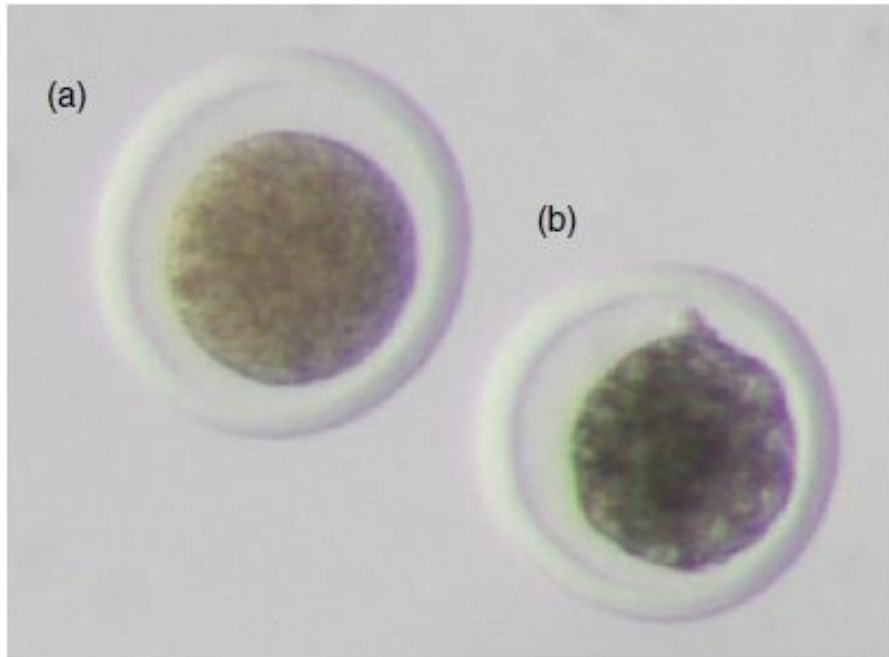
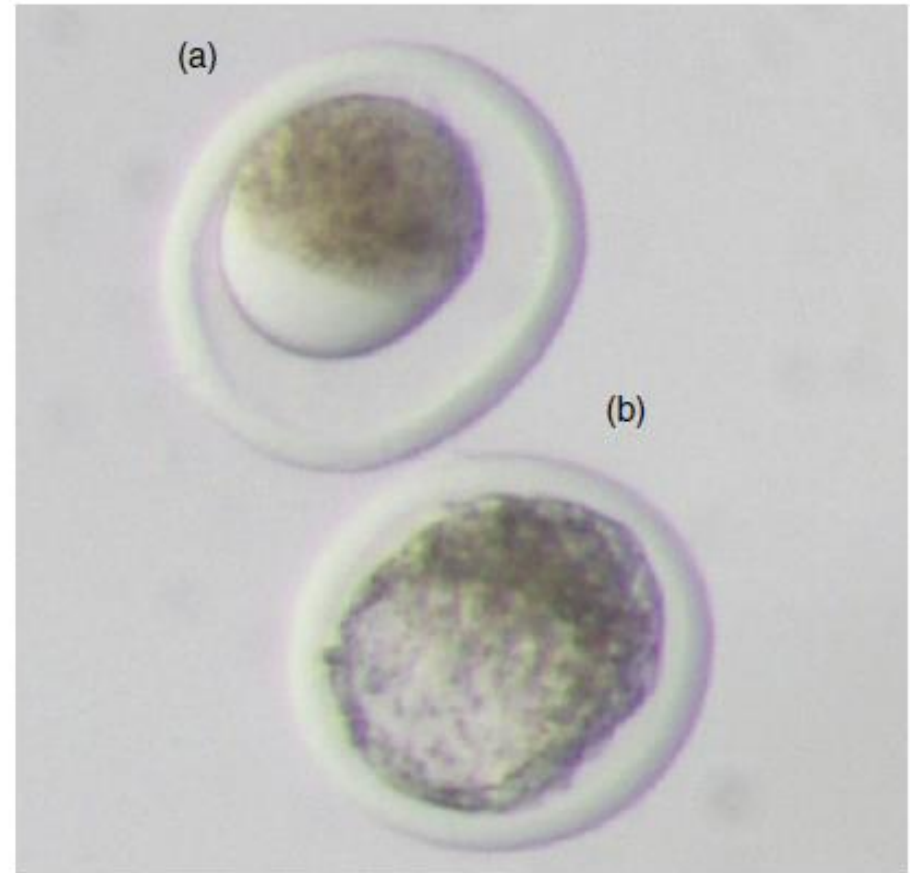


Figure 79.23 An unfertilized ovum (a) and excellent-quality compact morula stage embryo (b).

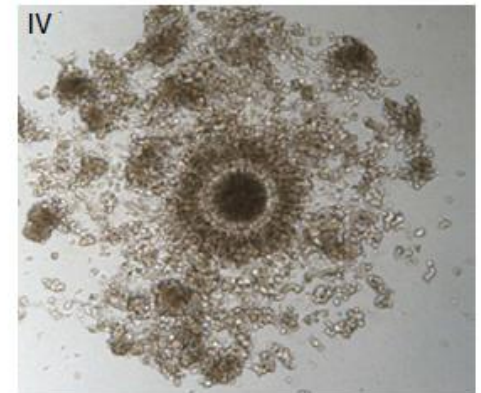
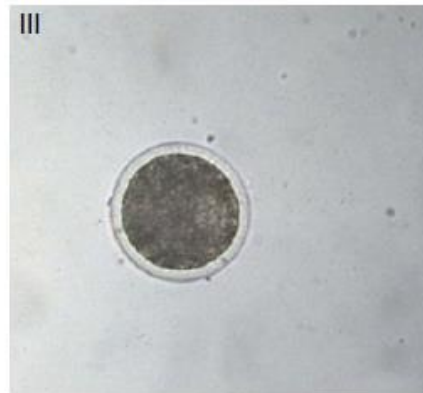
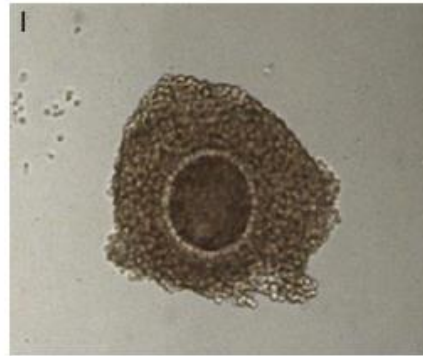




Biotechniki zaawansowane- pozyskiwanie komórek jajowych

Techniki izolacji oocytów :

- Aspiracja pęcherzyków
- Preparowanie całych pęcherzyków
- Przecinanie jajników
- Przecinanie po aspiracji
- Trawienie enzymatyczne
- Laparoscopia przez pochwę
- Ovum Pick-up





Biotechniki zaawansowane- pozyskiwanie komórek jajowych

Techniki izolacji oocytów :
Aspiracja pęcherzyków





Biotechniki zaawansowane- pozyskiwanie komórek jajowych

Techniki izolacji oocytów :
Przecinanie jajników

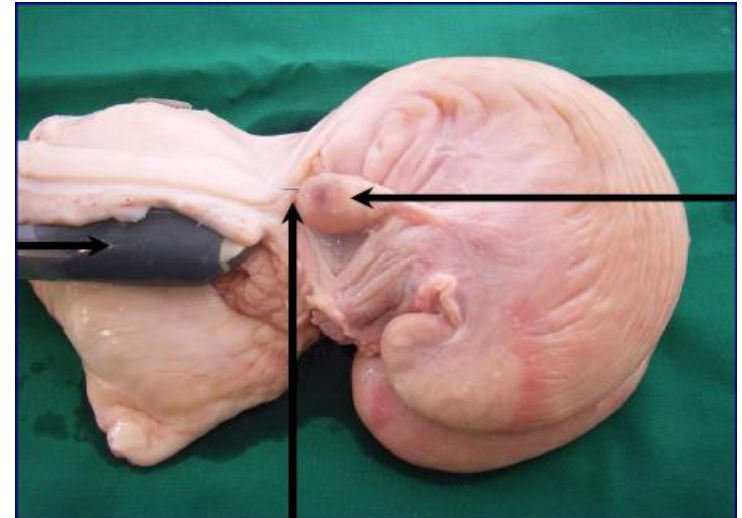




Biotechniki zaawansowane- pozyskiwanie komórek jajowych

Ovum Pick-up –Postępowanie:

- Wprowadzenie krowy do poskromu
- znieczulenie epiduralne (zewnątrzoponowe)
- Ręczne usunięciu kału z prostnicy
- Dokładne czyszczenie sromu
- Dopochwowe wprowadzenie nośnika USG
- transrektalne trzymanie jajnika
- jajnik musi być ułożony przed sondą USG
- aspiracja





Biotechniki zaawansowane- pozyskiwanie komórek jajowych

Ovum Pick-up –Postępowanie:





Biotechniki zaawansowane- pozyskiwanie komórek jajowych

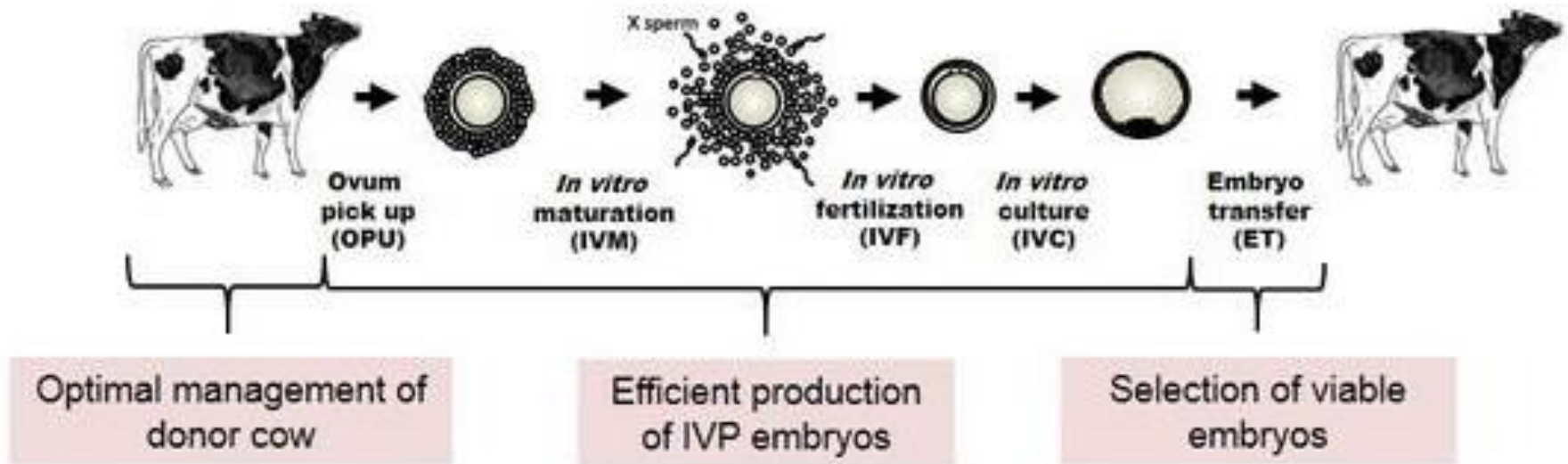
Warunki do Ovum Pick-up:





Biotechniki zaawansowane- pozyskiwanie komórek jajowych

Produkcja zarodków in vitro po Ovum Pick-up:

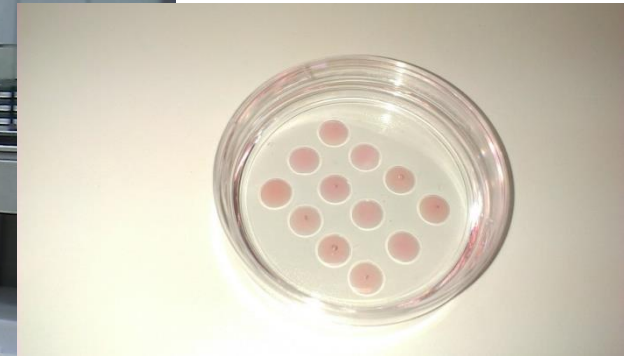


- ok. 4-8 COC na krowę, u jałówek nieco więcej w zależności od wieku
- OPU 2 razy w tygodniu przez ok 2mc., przerwa 2mc, ponowne OPU
- ok. 120 zarodków/krowę/rok, ok . 30- 40 cieląt rocznie od jednej samicy



Biotechniki zaawansowane- pozyskiwanie komórek jajowych

Pozyskiwanie jajników i kom. jajowych po zgonie osobnika (do 4h post mortem) :





Biotechniki zaawansowane- Klonowanie

SCNT- Transfer jąder komórek somatycznych (w UE tylko do celów naukowych):

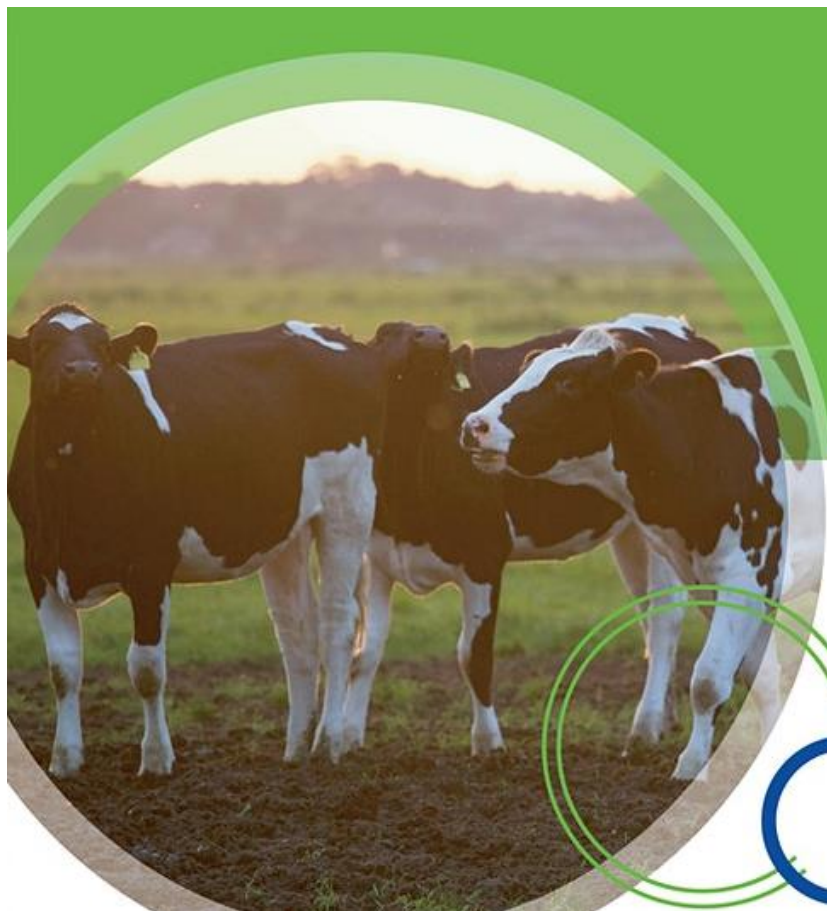
Metoda transferu jąder komórkowych polega na umieszczeniu w niezapłodnionej komórce jajowej jądra komórkowego pochodzącego z komórki somatycznej (SCNT).

Klonowanie to tworzenie organizmu, który jest dokładną, genetyczną kopią organizmu rodzicielskiego.





Dziękuję za uwagę



EIT Food SUDAPS

Warsztaty dla hodowców bydła i producentów mleka

Online: **3-4 grudnia**



This activity has received funding from the European Institute of Innovation and Technology (EIT), a body of the European Union, under the Horizon 2020, the EU Framework Programme for Research and Innovation.