

LIETUVOS SVEIKATOS MOKSLŲ UNIVERSITETAS  
VETERINARIJOS AKADEMIJA

**Giedrius Palubinskas**

**ŽEMO INTENSYVUMO LAZERIO  
STIMULIACIJOS IR KIAUŠIDŽIŲ DYDŽIO  
ĮTAKA SUPEROVULIJAI IR  
EMBRIONŲ IŠEIGAI**

Daktaro disertacija  
Žemės ūkio mokslai, veterinarija (02A)

Kaunas 2016

Disertacija rengta 2008–2015 metais Lietuvos sveikatos mokslų universitete Veterinarijos akademijoje, Anatomijos ir fiziologijos katedroje.

Mokslinis vadovas – prof. dr. Antanas Sederevičius (Lietuvos sveikatos mokslų universitetas, žemės ūkio mokslai, veterinarija – 02A).

Disertacija ginama Lietuvos sveikatos mokslų universiteto Veterinarijos mokslo krypties taryboje:

### **Pirmininkas**

prof. dr. Albina Aniulienė (Lietuvos sveikatos mokslų universitetas, žemės ūkio mokslai, veterinarija – 02A).

### **Nariai:**

prof. dr. Algimantas Paulauskas (Vytauto Didžiojo universitetas, biomedicinos mokslai, biologija – 01B);

dr. Asta Tvarijonavičiūtė (Barselonos autonominis universitetas, žemės ūkio mokslai, veterinarija – 02A);

prof. dr. Rasa Želvytė (Lietuvos sveikatos mokslų universitetas, žemės ūkio mokslai, veterinarija – 02A);

prof. habil. dr. Henrikas Žilinskas (Lietuvos sveikatos mokslų universitetas, žemės ūkio mokslai, veterinarija – 02A).

Disertacija bus ginama viešame Lietuvos sveikatos mokslų universiteto Veterinarijos akademijos Veterinarijos mokslo krypties tarybos posėdyje 2016 m. rugpjūčio 30 d. 13 val. dr. S. Jankausko auditorijoje.

Adresas: Tilžės g. 18, 47181, Kaunas, Lietuva.

LITHUANIAN UNIVERSITY OF HEALTH SCIENCES  
VETERINARY ACADEMY

**Giedrius Palubinskas**

**EFFECT OF LOW-LEVEL LASER  
IRRADIATION AND OVARIES SIZE ON  
THE SUPEROVULATORY RESPONSE AND  
EMBRYO YIELD**

Doctoral Dissertation  
Agricultural Sciences, Veterinary (02A)

Kaunas 2016

Dissertation has been prepared at the Department of Anatomy and Physiology, Veterinary Academy of Lithuanian University of Health Sciences during the period of 2008–2015.

Scientific supervisor:

prof. dr. Antanas Sederevičius (Lithuanian University of Health Sciences, Agricultural Sciences, Veterinary – 02A).

Dissertation is defending at the Veterinary Research Council of Lithuanian University of Health Sciences.

### **Chairperson**

prof. dr. Albina Aniulienė (Lithuanian University of Health Sciences, Agricultural Sciences, Veterinary – 02A).

### **Members:**

prof. dr. Algimantas Paulauskas (Vytautas Magnus University, Biomedical Sciences, Biology – 01B);

dr. Asta TvariJonavičiūtė (Autonomous University of Barcelona, Agricultural Sciences, Veterinary – 02A);

prof. dr. Rasa Želvytė (Lithuanian University of Health Sciences, Agricultural Sciences, Veterinary – 02A);

prof. habil. dr. Henrikas Žilinskas (Lithuanian University of Health Sciences, Agricultural Sciences, Veterinary – 02A).

Dissertation will be defended at the open session of the Veterinary Research Council of the Lithuanian University of Health Sciences, Veterinary Academy Dr. S. Jankauskas Auditorium at 1:00 p. m. on 30<sup>th</sup> of August, 2016.

Address: Tilžės 18, LT-47181 Kaunas, Lithuania.

# Turinys

|                                                                                            |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| SUTRUMPINIMAI .....                                                                        | 7  |
| IVADAS.....                                                                                | 8  |
| Darbo tikslas ir uždaviniai .....                                                          | 10 |
| Mokslinis darbo naujumas ir praktinė reikšmė .....                                         | 10 |
| Darbo apimtis.....                                                                         | 11 |
| 1. LITERATŪROS APŽVALGA.....                                                               | 12 |
| 1.1. Galvijų embrionų transplantacija pasaulyje.....                                       | 12 |
| 1.2. Embrionų transplantacijos efektyvumas .....                                           | 15 |
| 1.3. Karvių donorų atranka embrionų transplantacijai.....                                  | 17 |
| 1.4. Karvių reprodukcinio ciklo neuroendokrininė reguliacija .....                         | 19 |
| 1.5. Folikulų augimas kiaušidėse .....                                                     | 21 |
| 1.6. Superovuliacijos efektyvumą lemiantys veiksniai.....                                  | 24 |
| 1.7. Superovuliacijos protokolų tobulinimas .....                                          | 27 |
| 1.8. Dominuojančio folikulo pašalinimas .....                                              | 29 |
| 1.9. Estrogenų ir progesterono naudojimas folikulų augimo bangos<br>synchronizacijai ..... | 31 |
| 1.10. Kiaušidžių stimuliacija gonadotropiniais ir jų deriniais.....                        | 32 |
| 1.11. Stimuliacija rekombinantiniu galvijų somatotropinu.....                              | 35 |
| 1.12. Fizioterapija lazerio šviesa.....                                                    | 36 |
| 1.13. Lazerio šviesos poveikis ovocitų vystymuisi.....                                     | 38 |
| 1.14. Lazerio šviesos poveikis spermatozoidų judrumui ir apvaisinimo<br>galiai.....        | 40 |
| 1.15. Literatūros apžvalgos apibendrinimas .....                                           | 42 |
| 2. DARBO METODIKA .....                                                                    | 44 |
| 2.1. Tyrimų etapai, laikas, objektas, eksperimentų vykdymo schema....                      | 44 |
| 2.2. Pirmo tyrimų etapo eksperimento vykdymo metodika .....                                | 47 |
| 2.2.1. Tiriamos karvės, tiriamų karvių grupių sudarymo principai.....                      | 47 |
| 2.2.2. ŽILŠ stimuliacijos poveikio reprodukcinei karvių funkcijai<br>įvertinimas.....      | 47 |
| 2.3. Antro tyrimų etapo eksperimento vykdymo metodika .....                                | 50 |
| 2.3.1. Tiriamos karvės, tiriamų karvių grupių sudarymo principai.....                      | 50 |
| 2.3.2. Superovuliacijos sukėlimo be stimuliacijos ŽILŠ metodika.....                       | 52 |
| 2.3.3. Superovuliacijos sukėlimo su ŽILŠ stimuliacija metodika.....                        | 53 |
| 2.3.4. Embrionų išgavimo metodika .....                                                    | 54 |
| 2.3.5. Superovuliacijos efektyvumo nustatymo metodika .....                                | 55 |
| 2.3.6. Embrionų išsivystymo, kokybės ir išeigos nustatymo metodika.....                    | 56 |
| 2.4. Statistinio duomenų įvertinimo metodika .....                                         | 59 |

|                                                                                                           |     |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 3. TYRIMŲ REZULTATAI .....                                                                                | 60  |
| 3.1. ŽILŠ stimuliacijos poveikis reprodukcinei karvių funkcijai.....                                      | 60  |
| 3.1.1. Tiriamų ir kontrolinių karvių sergamumas metritais ir metritų gydymo trukmė .....                  | 60  |
| 3.1.2. Tiriamų ir kontrolinių karvių reprodukcijos rodiklių analizė ....                                  | 61  |
| 3.2. Superovuliacijos efektyvumas pagal kiaušidžių dydžio prieš ir po superovuliacijos skirtumą.....      | 65  |
| 3.3. Superovuliacijos efektyvumas pagal folikulų ir geltonkūnių skaičių po superovuliacijos .....         | 70  |
| 3.3.1. Superovuliacijos efektyvumas pagal folikulų skaičių po superovuliacijos.....                       | 71  |
| 3.3.2. Superovuliacijos efektyvumas pagal geltonkūnių skaičių po superovuliacijos.....                    | 73  |
| 3.4. Superovuliacijos efektyvumas pagal embrionų išėigą .....                                             | 76  |
| 3.5. Embrionų išsivystymas ir jų kokybė .....                                                             | 79  |
| 3.5.1. Tiriamų ir kontrolinių karvių embrionų skaičius pagal išplautų embrionų išsivystymo stadijas ..... | 79  |
| 3.5.2. Tiriamų ir kontrolinių karvių embrionų skaičius pagal išplautų embrionų kokybės klases .....       | 81  |
| 4. REZULTATŲ APTARIMAS .....                                                                              | 84  |
| IŠVADOS .....                                                                                             | 99  |
| REKOMENDACIJOS.....                                                                                       | 101 |
| LITERATŪROS ŠALTINIAI.....                                                                                | 102 |
| PASKELBTOS PUBLIKACIJOS DAKTARO DISERTACIJOS TEMA                                                         | 130 |
| KITOS PASKELBTOS PUBLIKACIJOS.....                                                                        | 130 |
| DALYVAVIMAS KONFERENCIJOSE.....                                                                           | 130 |
| SUMMARY .....                                                                                             | 153 |
| GYVENIMO APRAŠYMAS.....                                                                                   | 181 |
| PADĖKA.....                                                                                               | 182 |

## SUTRUMPINIMAI

| Trumpiniai        | Reikšmės                                                |
|-------------------|---------------------------------------------------------|
| ACTH              | Adrenokortikotropinis hormonas                          |
| ANOVA             | Dispersinė (daugiafaktorinė) analizė                    |
| ATP               | Adenozintrifosfatas                                     |
| bST               | Rekombinantinis galvijų somatotropinas                  |
| CIDR              | Intravagininis implantas, atpalaiduojantis progesteroną |
| COCs              | Kamuolinių ląstelių ir ovocito kompleksas               |
| DNR               | Deoksiribonukleorūgštis                                 |
| eCG               | Kumelių chorioninis gonadotropinas                      |
| FSH               | Folikulus stimuliuojantis hormonas                      |
| GH                | Augimo hormonas                                         |
| GnRH              | Gonadotropinus atpalaiduojantis faktorius               |
| hCG               | Žmonių chorioninis gonadotropinas                       |
| He–Ne             | Helis–neonas                                            |
| hmG               | Žmonių menopauzės hormonas                              |
| Hz                | Hercai                                                  |
| ICAR              | Tarptautinis gyvulių apskaitos komitetas                |
| IETS              | Tarptautinė embrionų transplantacijos asociacija        |
| IGF               | Insulininis augimo faktorius                            |
| IGF–I             | Panašus į insuliną augimo hormonas                      |
| J                 | Džaulis                                                 |
| LH                | Liuteinizuojantis hormonas                              |
| MAPK              | Kainazė                                                 |
| MPF               | Brendimą skatinantis faktorius                          |
| nm                | Nano metrai ( $10^{-9}$ metro)                          |
| NO                | Azoto oksidas                                           |
| p                 | Patikimumo kriterijus                                   |
| PGF <sub>2α</sub> | Prostaglandinas                                         |
| PKA               | Proteino fosfatazė                                      |
| pp                | <i>post partum</i>                                      |
| r                 | Koreliacijos koeficientas                               |
| RNR               | Ribonukleino rūgštis                                    |
| ROS               | Reaktyvioji deguonies rūšis                             |
| TSH               | Skydliaukę stimuliuojantis hormonas                     |
| TV                | Tarptautinis vienetas                                   |
| ŽILŠ              | Žemo intensyvumo lazerio šviesa                         |

## IVADAS

Pienininkystė yra viena iš svarbiausių Lietuvos žemės ūkio šakų, jau daugybę metų sukurianti ne mažiau kaip penktadalį visos šalyje pagaminamos žemės ūkio produkcijos vertės. Dėl pieno supirkimo kainų svyravimo daugelis Lietuvos pieno gamintojų pastaruoju metu dirba nuostolingai, todėl, norėdami konkuruoti bendroje pieno sektoriaus rinkoje, jie yra priversti modernizuoti technologškai pasenusius ūkius, gerinti melžiamų karvių veislinę vertę ir didinti jų produktyvumą.

Rothschild ir Plastow (2014) savo studijoje aprašė, kad XX amžiuje gyvulių produktyvumas daugelyje išsivysčiusių šalių didėjo dėl visaverčio ir gyvulio poreikius atitinkančio šėrimo, kryptingos selekcijos, gyvulių sėklinimo, embrionų transplantacijos, veiksmingos gyvūnų ligų prevencijos ir kontrolės. Šiame amžiuje produktyviausių pasaulyje pieninių bandų savininkai Izraelyje, JAV ir Kanadoje pagrindinį dėmesį skiria ne karvių šėrimo ar laikymo technologijų, bet veislininkystės darbo gerinimui. Šiaurės Amerikos pieno gamintojų įsitikinimu, embrionų transplantacija yra neatsiejama pieninių karvių veislinės vertės ir produktyvumo gerinimo dalis. Didžioji dalis veršelių pažangiausiose JAV ir Kanados veislinėse bandose yra gaunami po embrionų transplantacijos procedūrų.

Galvijų embrionų transplantacija Lietuvoje pirmą kartą buvo atlikta 1983 metais Lietuvos gyvulininkystės mokslinio tyrimo institute. Dr. P. Pakėno iniciatyva suburta mokslininkų grupė įdiegė šį metodą praktikoje, tačiau dėl didelių kaštų ir nepalankios tuometinės Tarybų Lietuvos žemės ūkio politikos embrionų transplantacija buvo pamiršta ir nebevykdoma.

Tačiau pasaulyje jau daugelį metų embrionų transplantacijos *in vivo* metodu per metus išgaunama vidutiniškai apie 700 000 transplantacijai tinkamų embrionų. Vienas iš pagrindinių veiksnių, stabdančių šio brangaus metodo dar platesnį naudojimą genetiškai perspektyvių galvijų veisimui pasaulyje, yra labai plačiai varijuojantis ir neprognozuojamas superovuliacijos efektyvumas (Keller, Teepker, 1990; Kafi, McGowan, 1997). Superovuliacijos efektyvumo nenusipėjamumo problemą akcentavo Donaldson (1984), teigęs, kad iš 1263 karvių donorių 32,4 % atvejų nebuvo gauta nė vieno transplantacijai tinkamo embriono, o gerų, t. y. transplantacijai tinkamų, embrionų dalis nuo visų išplautų embrionų ir neapvaisintų ovocitų vidutiniškai sudarė tik 45 %.

Tonhati ir kitiems mokslininkams (1999) nustačius, kad gyvulio organizmo atsakas į superovuliaciją nėra paveldimas ir negali būti prognozuojamas pagal ankstesnius superovuliacijos rezultatus, imta ieškoti

kitų veiksnių, galinčių įtakoti superovuliacijos efektyvumą ir transplantuojamų embrionų išeigą.

Europos mokslininkai ir embrionų transplantacijos specialistai, negalėdami donorėms skirti estrogenų naujos folikulų bangos augimo sinchronizacijai, superovuliacijos atsako nenuospėjamumo problemą bando spręsti ultragarsinio tyrimo duomenimis paremta griežtesne donorių atranka, orientuota į kuo didesnę kiaušidėse nustatomų folikulų skaičių prieš superovuliaciją (Mapletoft, Bo, 2012). Mokslinis pagrindimas tokiam donorių atrankos būdui buvo paskelbtas 2004 metais (Jaiswal et al., 2004; Singh et al., 2004).

Tačiau mokslinėje literatūroje nepakanka duomenų apie tai, kokiais metodais būtų galima nustatyti ar prognozuoti pradėsiančių augti folikulų skaičių. Todėl būtina atlikti daugiau mokslinių tyrimų siekiant identifikuoti svarbiausius kiaušidžių funkcinės būklės rodiklius, pagal kuriuos prieš superovuliaciją galima būtų prognozuoti busimą superovuliacijos efektyvumą ir embrionų išeigą.

Nors per paskutiniuosius 30 metų transplantacijai tinkamų embrionų išeiga didėjo vidutiniškai nuo 45 % (Donaldson (1984) iki 60 % (Hussein et al., 2014; Drillich et al., 2012), tačiau embrionų transplantacijos specialistai ir mokslininkai konstatuoja, kad ir dabar neretai išplaunama didesnė procentinė dalis neapvaisintų ovocitų, blogos kokybės, degeneruotų ir transplantacijai netinkamų embrionų (Garcia Guerra et al., 2012). Tai padidina embrionų transplantacijos būdu gaunamų veršelių savikainos kaštus. Taigi, embrionų kokybę gerinančių veiksnių nustatymas leistų padidinti transplantacijai tinkamų embrionų išeigą.

Pagal Blondin ir kitus mokslininkus (2012) ovocito kokybė yra labiausiai įtakojama jam augant ir bręstant folikulo skystyje. Todėl, norėdami pagerinti jų kokybę, turime rasti efektyvių terapijos ar stimuliacijos priemonių, veikiančių ovocitus šioje vystymosi stadijoje.

Ieškant naujų, efektyvesnių ir natūralių gydymo ir profilaktikos būdų, vis plačiau diskutuojama apie lazerį kaip šviesos terapijos įrenginį, perspektyvų ir ekologišką gydymo metodą. Žemo intensyvumo (iki 1500 mW) lazeriai (ŽILŠ) dažniausiai naudojami kaip fizioterapijos aparatai, kurių skleidžiamą spinduliuotę gyvajame organizme sugeria įvairūs chromatoforai, fermentai, pigmentai, baltymai, deoksiribonukleorūgštys (Chung et al., 2012). Šio tipo lazerio poveikis yra gana platus: stimuliuoja regeneracinius procesus, mažina skausmą, uždegimą, teigiamai veikia įvairių ląstelių metabolinius procesus, skatina fagocitozę, imuninį atsaką (Huang et al., 2009; Karu, 2010) ir pastaruoju metu vis plačiau naudojamas medicinoje ir veterinarijoje (Poyton, Ball, 2011).

Wenbin su kitais mokslininkais (1996) įrodė, kad *in vitro* veikiant spermą lazeriu padidėja fruktozės fermentacija, suintensyvėja ląstelių kvėpavimo procesai, greičiau pernešami elektronai, padidėja fosforo sunaudojimas ir kalcio absorbcija, o visi šie procesai padidina spermatozoidų gyvybingumą ir apvaisinimo galią. Teigiamą ŽILŠ stimuliacijos poveikį gyvūnų reprodukinei funkcijai patvirtino 2015 metais publikuoti faktai apie tai, kad fotomoduliaciniu poveikiu pasižyminčios ŽILŠ spindulių bangos gali būti taikomos atliekant stimuliaciją gyvūnų lytinių ląstelių (spermatozoidų ir ovocitų) funkcijų suaktyvinimui, apvaisinimo pagerinimui ir embrionų produkcijoje *in vitro* metodu (Abdel-Salam, Harith, 2015). Kadangi mokslinėje literatūroje nepakanka duomenų apie ŽILŠ spinduliuotės poveikį galvijų reprodukinei funkcijai *in vivo*, todėl būtina tai ištirti ir, gavus teigiamą rezultatą, nustatyti šios spinduliuotės poveikį superovuliacijos efektyvumui *in vivo*, embrionų vystymuisi, jų kokybei ir išeigai.

Atsižvelgus į visas aukščiau išsakytas mintis ir prielaidas, buvo suformuotas darbo tikslas ir uždaviniai.

### **Darbo tikslas ir uždaviniai**

**Darbo tikslas** – įvertinti pieninių karvių kiaušidžių dydžio reikšmę prognozuojant superovuliacijos rezultatus ir ŽILŠ stimuliacijos *in vivo* įtaką karvių reprodukinei funkcijai.

#### **Darbo uždaviniai:**

1. Ištirti ŽILŠ stimuliacijos *in vivo* įtaką pieninių karvių reprodukcijos rodikliams.
2. Nustatyti ŽILŠ stimuliacijos *in vivo* poveikį kiaušidžių dydžiui po superovuliacijos, geltonkūnių ir folikulų skaičiui bei embrionų išeigai.
3. Įvertinti sąsajas tarp kiaušidžių dydžio, jų padėties kūno pusės atžvilgiu prieš superovuliaciją ir superovuliacijos rezultatų.
4. Nustatyti ŽILŠ stimuliacijos įtaką embrionų išsivystymui ir jų kokybei.

### **Mokslinis darbo naujumas ir praktinė reikšmė**

Atliktais tyrimais buvo pagrįstas požiūris, kad stimuliacija ŽILŠ yra perspektyvus ir ekologiškas gydymo ir profilaktikos metodas. Pirmą kartą Lietuvoje ir pasaulyje *in vivo* buvo įvertinta ŽILŠ stimuliacijos įtaka

pieninių galvijų reprodukcinei funkcijai, bei įrodytas teigiamas jos poveikis superovuliacijos efektyvumui ir transplantacijai tinkamų embrionų išeigai. Tyrimo metu sukurtas inovatyvus superovuliacijos efektyvumo ir embrionų išeigos prognozavimo metodas, kuris pagal kiaušidžių dydį prieš superovuliaciją leis embrionų transplantacijos specialistams sumažinti superovuliacijos nenuospėjamumą.

Visa tai turės didžiulę praktinę ūkinę naudą: sumažėjus superovuliacijos nenuospėjamumui ir padidėjus transplantacijai tinkamų embrionų išeigai bus ženkliai sumažinti embrionų transplantacijos kaštai, todėl šis metodas dar intensyviau ir plačiau bus naudojamas pasaulyje, kaip pažangus, spartus ir ekonomiškai naudingas produktyvių galvijų veisimo būdas.

### **Darbo apimtis**

Darbą sudaro šios dalys: įvadas, literatūros apžvalga, tyrimų metodai ir atlikimas, rezultatai, aptarimas, išvados, rekomendacijos, naudoti literatūros šaltiniai (339 šaltiniai), paskelbtos publikacijos disertacijos tema, kitos paskelbtos publikacijos, dalyvavimas konferencijose, disertacijos santrauka (angl. summary) anglų kalba, gyvenimo aprašymas ir padėka.

Darbo apimtis 182 puslapiai, iliustruota 23 lentelės, 18 paveikslų.

# 1. LITERATŪROS APŽVALGA

## 1.1. Galvijų embrionų transplantacija pasaulyje

Embrionų transplantacija – procesas, kurio metu embrionai surenkami iš donorių ir perkeliama į recipientių (surogatių motinų) gimdą tolesniam vystymuisi (Curtis, 1991). Vykdamas galvijų embrionų transplantaciją paprastai atliekamos šios procedūros: rujos sinchronizacija, superovuliacijos sukėlimas, donorės apsėklinimas, embrionų išgavimas 7 parą po sėklinimo ir gyvų ar šaldytų embrionų persodinimas recipientėms. Daugeliu atvejų galvijų embrionai yra plaunami ir persodinami recipientėms nechirurginiu būdu, o šios procedūros dažniau atliekamos fermose nei specializuotose galvijų klinikose (Hasler, 2003).

Daugelyje mokslinių straipsnių nurodoma, kad galvijų embrionų transplantacija ir superovuliacija plačiai pradėta taikyti 1970 metais (Mapletoft, Hasler, 2005; Farin et al., 2007; Machaty et al., 2012; Hasler, 2014). Literatūros duomenimis, pirmoji sėkminga žinduolių embrionų transplantacija buvo atlikta 1890 metais triušiams (Betteridge, 2003). 1949 metais Umbaugh pirmasis atliko embrionų transplantaciją galvijams, veršingomis tapo 4 karvės, tačiau veršeliai nebuvo išnešioti (Umbaugh, 1949). Pirmoji sėkminga galvijų embrionų transplantacija pasaulyje atlikta 1951 metais. Iš chirurginės intervencijos būdu recipientei persodinto 5 parų amžiaus embriono atvestas veršelis laikomas pirmuoju pasaulyje veršeliu, gautu iš persodinto embriono (Willett et al., 1951; Betteridge, 1981).

Atvestas sveikas veršelis paskatino įvairių šalių mokslininkus tęsti ir tobulinti šį veisimo metodą, todėl jau 1970 metais Šiaurės Amerikoje galvijų embrionų transplantacija pradėta naudoti komerciniais tikslais siekiant padidinti europietišku galvijų veislių populiaciją (Hasler, 2003). Tuo pačiu metu buvo įkurta ir IETS (*International Embryo Transfer Society* – Tarptautinė embrionų transplantacijos asociacija), kuri kiekvienais metais renka duomenis apie embrionų transplantacijos rezultatus. Jos surinkti ir pateikti duomenys atspindi praktinį embrionų transplantacijos metodo panaudojimą ir įtaką atskiroms gyvulininkystės šakoms. Nustatyta, kad embrionų persodinimas didžiausią naudą duoda pieninėje ir mėsinėje galvijininkystėje (Mapletoft, 2013).

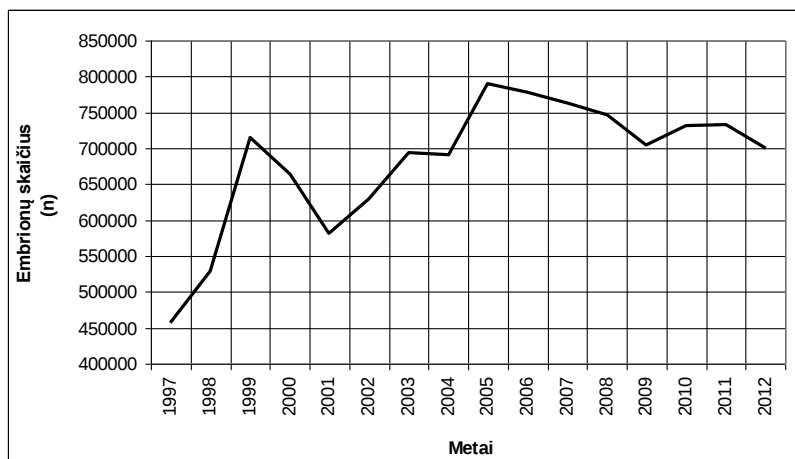
Galimybė iš produktyvios karvės per metus gauti daugiau kaip vieną palikuonį labai greitai išpopuliarino embrionų transplantaciją visame pasaulyje, kaip inovatyvų ir pagreitintą aukštos veislinės vertės gyvulių

veisimo būdą. Jo raidoje galima būtų išskirti tris vystymosi etapus, kuriuos savo darbuose apžvelgė Betteridge (2003), Hasler (2003, 2004). Pirmajame embrionų transplantacijos etape, po superovuliacijos, embrionai buvo išgaunami chirurginiu būdu *in vivo* metodu, vėliau – išplaunami, naudojant kateterius ir specialias terpes. Antrame etape buvo pradėta persodinti embrionus, gautus iš *in vitro* būdu apvaisintų ovocitų. Vėliau šį metodą pradėta derinti su genų inžinerija, kuri įgalino perkelti genus iš vieno tos pačios rūšies genomo į kitą, keisti vienus nukleotidus kitais arba tiesiog juos pašalinti. Šio metodo praktinis rezultatas – sukurti transgeniniai organizmai.

Pirmajame embrionų transplantacijos etape praėjusio amžiaus aštunto dešimtmečio viduryje paskelbti moksliniai straipsniai apie sėkmingus bandymus išgaunant ir persodinant galvijų embrionus nechirurginiu būdu (Elsden et al., 1976; Rowe et al., 1976; Drost et al., 1976) davė didelį postūmį šio metodo plėtrai Šiaurės Amerikoje, Europoje, Japonijoje ir Australijoje. Po keleto metų embrionų išgavimas nechirurginiu būdu jau buvo plačiai naudojamas praktikoje (Hasler, 2003, Rowe et al., 1980).

1973 metais paskelbta informacija apie pirmus sėkmingus bandymus persodinant po gilaus užšaldymo atšildytus embrionus (Wilmut, Rowson, 1973) dar labiau paspartino šio metodo plėtrą.

Embrionų transplantacijos mastai pasaulyje kasmet augo, tačiau ypač didelis šuolis įvyko laikotarpiu nuo 1997 iki 2005 metų. Per 8 metus išplaunamų embrionų skaičius pasaulyje IETS duomenimis padidėjo 73,14 % (nuo 456 258 iki 789 972 embrionų per metus) (1 pav.).



**1 pav.** Per metus *in vivo* metodu išplaunamų embrionų skaičius pasaulyje nuo 1997 iki 2012 metų (Perry, 2013)

2007 metais pasaulyje jau buvo išgaunama daugiau kaip pusė milijono galvijų embrionų (577 900), iš kurių 50 % buvo persodinti iš karto recipientams, t. y. „šviežūs“, o kita dalis – po užšaldymo–atšildymo (Thibier, 2008).

Pasaulyje per 2013 metus daugiausia embrionų plovimų atlikta JAV (n=44 685), kurių metu gauta 301 671 transplantacijai tinkamų embrionų, vidutiniškai po 6,75 embriono iš donorės. Embrionų transplantacijos lyderėmis pasaulyje tampa JAV ir Kanada. IETS duomenimis, šiose šalyse 2013 metais išplauta beveik 54 % visų per metus pasaulyje *in vivo* metodu išgautų embrionų (1 lentelė).

**1 lentelė.** *In vivo metodu gautų transplantacijai tinkamų galvijų embrionų kiekis pasaulyje per 2013 metus (Perry, 2014)*

| Regionas               | Išplauta donorių (n) | Gauta transplantacijai tinkamų embrionų (n) | Procentinė dalis nuo visų išplautų embrionų skaičiaus pasaulyje (%) |
|------------------------|----------------------|---------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------|
| <b>Afrika</b>          | 1 081                | 8 461                                       | 1,16                                                                |
| <b>Azija</b>           | 9 391                | 105 249                                     | 14,43                                                               |
| <b>Europa</b>          | 22 316               | 135 711                                     | 18,61                                                               |
| <b>Šiaurės Amerika</b> | 57 735               | 392 530                                     | 53,83                                                               |
| <b>Okeanija</b>        | 2 837                | 14 525                                      | 1,99                                                                |
| <b>Pietų Amerika</b>   | 12 545               | 72 770                                      | 9,98                                                                |
| <b>Iš viso:</b>        | <b>105 905</b>       | <b>729 246</b>                              | <b>100</b>                                                          |

Europoje 2013 metais, IETS duomenimis, daugiausia pieninių karvių embrionų donorių išplauta Prancūzijoje (n=7205, vid. 5,3 embriono), Olandijoje (n=4308, vid. 6,2 embriono) ir Vokietijoje (n=2573, vid. 6,8 embriono) (Perry, 2014).

Manoma, kad embrionų transplantacija lėmė spartų produktyvumo augimą daugelyje JAV pieno ūkių (Stroud, 2012). 2013 metais vidutinis primilžis šioje šalyje iš 9,221 mln. karvių pasiekė 10 613,00 kg (60 % daugiau nei Lietuvoje, 2013 metų ICAR duomenys) iš karvės per 305 laktacijos dienas. Taigi, embrionų transplantaciją galima apibūdinti kaip pažangų, praktikoje pasiteisinusį ir pagreitintą produktyvių galvijų veisimo būdą.

Aukštos genetinės vertės embrionai tapo paklausia preke visame pasaulyje ir užšaldyti talpose su skystu azotu buvo gabenami iš vienos šalies į kitą. 2011 metais Šiaurės Amerikoje papildomai išplauta 30 000 galvijų embrionų eksportui, iš jų 13 737 – Kanadoje (Stroud, 2012). Komercinė embrionų transplantacija tapo didžiuliu, gerai organizuotu tarptautiniu

verslu (Betteridge, 2003). Tai buvo pigesnis ir saugesnis (neplatinamos infekcinės ligos) būdas gerinant galvijų bandų genetinį potencialą, nei gyvų veislinių gyvulių įsivežimas (Otter, 1994). Parduodamų embrionų kaina priklauso nuo donorės, jos protėvių genetinių savybių ir embriono apvaisinimui naudotos buliaus spermos vertės ir gali svyruoti nuo kelių tūkstančių iki kelių dešimčių ar net šimtų tūkstančių dolerių (Genzebu, 2015). Autoriaus teigimu, komercinė embrionų transplantacijos programų sėkmė priklauso nuo transplantacijos specialistų įgūdžių ir patirties, tinkamų recipientų, tiksliai sinchronizuotų donorių ir recipientų rūšių, jei persodinami šviežūs embrionai, embrionų kokybės ir embrionų saugojimo ir persodinimo procedūrų.

## **1.2. Embrionų transplantacijos efektyvumas**

Embrionų transplantacijos metodo efektyvumas yra vertinamas pagal du kriterijus: superovuliacijos efektyvumą (išplautų ir transplantacijai tinkamų embrionų skaičių) ir recipientų veršingumo indeksą (veršingomis tapusių recipientų skaičių procentais po pirmo embriono persodinimo) (Gordon, 2004).

Vienas iš pagrindinių veiksnių, stabdančių embrionų transplantacijos metodo dar platesnį naudojimą veislininkystės programose, yra sunkiai prognozuojamas superovuliacijos atsakas (Kafi, McGowan, 1997, Mapletoft, Bo, 2012), tai vienas iš kritiškiausių ir sunkiausiai prognozuojamų etapų embrionų transplantacijos protokole (Andrade et al., 2003).

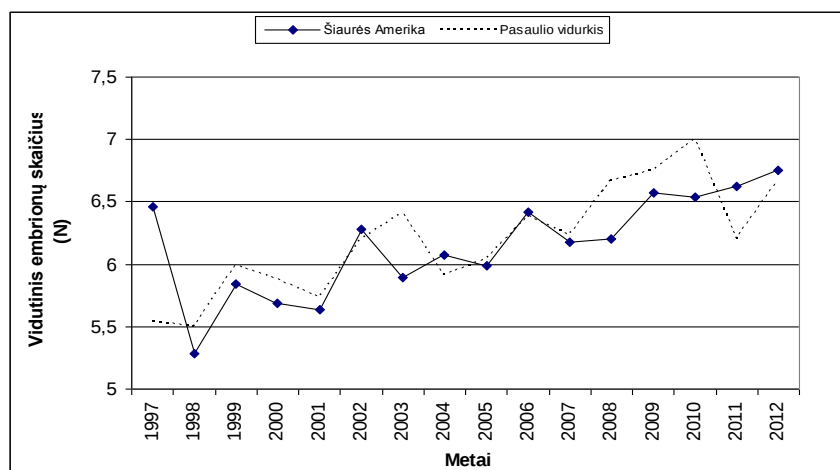
Superovuliacijos metu donorių kiaušidės yra stimuliuojamos hormoniniais preparatais, siekiant gauti kuo didesnę skaičių pakankamai subrendusių ovocitų, galinčių po apvaisinimo išsivystyti iki transplantacijai tinkamų embrionų (Singh et al., 2004). Tačiau superovuliacijos rezultatai pagal išplaunamų ir transplantacijai tinkamų embrionų kiekį labai skiriasi. Iš tuo pat metu pagal vienodą superovuliacijos protokolą stimuliuotų donorių gali būti išplaunama nuo 0 iki 50, o retais atvejais ir dar daugiau embrionų. Šis kintamas superovuliacijos atsakas yra vienas iš sunkiausių iššūkių atliekant sėkmingas embrionų transplantacijos programas galvijams (Mapletoft et al., 2002; Barros, Nogueira, 2004; Baruselli et al., 2006). Embrionų transplantacijos praktikų pastebėjimais, iš maždaug 20–25 % donorių negaunama nė vieno transplantacijai tinkamo embriono, nors iš daugelio jų ankstesnių plovimų metu buvo išplautas pakankamas embrionų skaičius. Praktikų skelbiamą informaciją patvirtino Baruselli ir kiti

mokslininkai (2006), paskelbė, kad 20–30 % donorių neatsako į superovuliaciją.

Pagal Seidel ir kolegas 2003 metais iš 27 % visų sveikų donorių buvo gauta nuo 0 iki 1 embriono, o 54 % donorių produkavo nuo 2 iki 10 embrionų, ir tik iš 20 % donorių išskirta 11 ir daugiau embrionų (Seidel et al., 2003).

Looney (1986) paskelbė, kad iš 2048 mėsinių galvijų vidutiniškai buvo gauta po 6 transplantacijai tinkamus embrionus, tačiau 24 % donorių daryta superovuliacija nebuvo sėkminga, nes iš jų nebuvo išplauta nė vieno embriono, o iš 30 % donorių buvo išplauta vidutiniškai po 14 embrionų, kas sudarė 70 % visų tyrimo metu išgautų embrionų. Analogiški superovuliacijos efektyvumo ir embrionų išeigos svyravimai užfiksuoti ir atlikus bandymus su daugiau kaip 987 pieninių galvijų grupe (Lerner et al., 1986).

Vidutinis išplaunamų embrionų skaičius pasaulyje daugelį metų beveik nekito ir svyruoja intervale tarp 5–7 iš vienos donorės (Hasler, 1992, 2006). Vidutinis *in vivo* metodu išplaunamų embrionų skaičius pasaulyje nuo 1997 iki 2012 metų pateikiamas 2 pav.



**2 pav.** Vidutinis *in vivo* metodu išplaunamų embrionų skaičius Šiaurės Amerikoje ir pasaulyje nuo 1997 iki 2012 metų (Perry, 2013)

Iki 2000 metų, pagal Garcia Guerra ir kitus mokslininkus (2015), iš vienos pieninių galvijų donorės *in vivo* metodu pasaulyje vidutiniškai buvo išgaunama apie 5,5 transplantacijai tinkamo embriono ir tik per pastaruosius 15 metų šis skaičius padidėjo iki 6,7. Šių mokslininkų duomenimis, 22% pasaulinį embrionų išeigos *in vivo* padidėjimą sąlygojo ženkliai išaugęs

vidutinis išplaunamų embrionų skaičius JAV ir Kanadoje (2 pav.), kur išgaunama didžioji dalis visų transplantacijai tinkamų embrionų pasaulyje.

Įvairiose šalyse atlikti gausūs tyrimai keičiant vienus hormoninius preparatus kitais, bandant įvairias jų dozes ir kombinacijas, gerinant gyvulių laikymo sąlygas, šėrimą ir pan. laukiamų rezultatų nedavė, nes superovuliacijos nenuspėjamumas išliko. Pastaruoju metu mokslininkai, bandydami spręsti šią problemą, vis daugiau dėmesio skiria donorių reprodukcijos organų funkcinės būklės įvertinimui prieš superovuliaciją ir galimų sąsajų su superovuliacijos atsaku nustatymu, todėl donorių atranka tampa vienu iš svarbiausių etapų embrionų transplantacijoje.

### **1.3. Karvių donorių atranka embrionų transplantacijai**

Vykdam donorių atranką embrionų transplantacijai pirmiausia turi būti atsižvelgiama į gyvulio genetinį potencialą, reprodukcijos savybes, būsimų palikuonių vertę ir jų poreikį rinkoje (Mapletoft, 1985).

Donorės negali turėti reprodukcinių sutrikimų, turi turėti gerai funkcionuojančius lytinius organus, gerus vaisos rodiklius, būti kliniškai sveikos ir neturėti sužeidimų (Hasler, 1992). Donorės turi būti pradedamos stebėti iš karto po apsiveršiavimo, jos turi turėti reguliary lytinį ciklą, besikartojantį kas 18–24 paras. Superovuliacijos sukėlimą galima pradėti ne anksčiau kaip 60 parų po apsiveršiavimo arba pasibaigus pieno pikui, kai primelžiamo pieno kiekis pradeda mažėti. Pagal Selk (2013), atrenkant donores embrionų transplantacijai labai svarbus rodiklis yra reguliarus lytinis ciklas kiekvienos laktacijos metu ir ne didesnis sėklinimo indeksas kaip 2 kartai kiekvienam veršingumui. Laikotarpis tarp apsiveršiavimų turi būti apie 365 paros, donorė negali būti sirgusi pūlingu metritu ar turėjusi kokių nors kitų reprodukcijos sutrikimų.

Donorių amžius yra svarbus faktorius, lemiantis išplaunamų embrionų skaičių (Hasler et al., 1983). Nustatyta, kad iš telyčių išplaunama mažiau embrionų nei iš vyresnių karvių (Stroud, Hasler, 2006), tačiau nuo 10 metų amžiaus donorių atsakas į superovuliaciją silpnėja, kartu mažėja ir išplaunamų embrionų skaičius (Hasler et al., 1983). Daugelis mokslininkų pripažįsta, kad pieninių karvių donorių amžiaus įtaka superovuliacijos efektyvumui yra ženkliai reikšmingesnė, nei mėsinio tipo karvių, kurios tik vyresnės nei 10 metų pradeda silpniau reaguoti į superovuliaciją sukeliančius hormonus (Stroud, Hasler, 2006).

Šėrimo įtaką embrionų transplantacijos rezultatams tyrė daug mokslininkų. Buvo įrodyta, kad mėsinių veislių telyčių, užtektinai gavusių koncentruotų pašarų, superovuliacijos rezultatai ir išplautų embrionų kokybė

buvo žymiai geresnė, nei kontrolinės grupės telyčių, kurios per parą gaudavo normuotą 3 kg koncentratų davinį (Yaakub et al., 1999). Donorės turi būti tinkamai šeriamos, atsižvelgiant į gyvulio fiziologinius poreikius ir duodamo pieno kiekį. Kadangi nutukusių ir išliesėjusių karvių vaisos rodikliai prastėja, todėl labai svarbu, kad donorės superovuliacijos metu būtų reikiamos kondicijos (Selk, 2013). Nustatyta, kad nutukusioms karvėms dažniau susidaro kiaušidžių cistos, superovuliacijos atsakas yra silpnas, superovuliacijos metu ovuliuojančių ovocitai yra nevisaverčiai, prastai apsivaisina, o riebalais apaugę lytiniai organai komplikuoja embrionų išplovimo procedūras (Stroud, Hasler, 2006).

Daugelis embrionų transplantacijos specialistų įsitikinę, kad papildomas organinės kilmės mineralinių papildų davimas donorėms prieš superovuliaciją gali padidinti išplaunamų embrionų skaičių ir transplantacijai tinkamų embrionų kokybę. Tačiau mokslinio tyrimo metu buvo nustatyta, kad organinės kilmės mineralinių papildų davimas (lyginant su neorganinės kilmės papildais) donorėms prieš superovuliaciją pagerino tik transplantacijai tinkamų embrionų kokybę ir neturėjo jokios įtakos išplaunamų embrionų skaičiui (Lamb et al., 2004).

Pastaraisiais metais mokslininkai superovuliacijos atsako nenuspėjamumo problemą bandė spręsti parenkant karves donores, kurių kiaušidėse nustatomas kuo didesnis folikulų skaičius prieš superovuliacijos pradžią (Mapletoft, Bo, 2012). Manoma, kad padidėjusį išplaunamų embrionų skaičių iš donorės Šiaurės Amerikos šalyse lėmė Europoje draudžiamų hormoninių preparatų (estrogenų) papildomas panaudojimas superovuliacijos metu. Efektyvesnės, patobulintos superovuliacijos schemos JAV ir Kanadoje buvo kuriamos remiantis Nasser ir kitų mokslininkų (1993) pateiktais faktais, kad superovuliacijos efektyvumas išauga pradėjus leisti gonadotropinus naujos folikulų bangos augimo pradžioje, o dominuojančio folikulo buvimas yra neigiamas faktorius, bloginantis superovuliacijos atsaką (Guilbault et al., 1991; Bungartz, Niemann, 1994). Nors naujos superovuliacijos schemos leido kontroliuoti folikulų bangos augimo pradžią, šiek tiek pagerino superovuliacijos efektyvumą ir embrionų išeigą, tačiau superovuliacijos atsako nenuspėjamumas išliko (Bo et al., 2002, 2006). Todėl mokslininkai, atsižvelgdami į karvių reprodukcinio ciklo neuroendokrininę reguliaciją, įvairiomis hormonų aplikacijomis imituodami natūralią folikulus stimuliuojančio hormono (FSH) ir liuteinizuojančio hormono (LH) koncentracijos kaitą gyvulio organizme, toliau tobulina kiaušidžių stimuliacijos schemas.

#### 1.4. Karvių reprodukcinio ciklo neuroendokrininė reguliacija

Reprodukcinę karvių funkciją reguliuoja parakrininė ir endokrininė sistemos, kurioms yra būtini imuniniai ir neuroendokrininiai pokyčiai. Karvių lytinio ciklo metu tam tikrais periodais kinta kiaušidžių struktūra, lytinių hormonų koncentracija gimdos gleivinėje ir kraujyje (Schams et al., 2002).

Lytinio ciklo reguliavimo sistemos gali būti realizuojamos per specifinius proteinus, autokriniškai ir parakriniškai veikiančius ląstelių dauginimąsi ir audinių transformaciją (pvz. folikulo vartimą į geltonąjį kūną). Parakrininiai hormonai pernešami santykinai nedideliu atstumu ir sąveikauja su kaimyninių ląstelių savitaisiais receptoriais. Reguluojant reprodukcinę funkciją aktyviai dalyvauja inhibinas, aktyvinas ir insulininis augimo faktorius (IGF). IGF yra baltymas, kuris sekretuojamas kepenyse veikiant augimo hormonui (Findlay et al., 1996). Chemine sudėtimi jis panašus į proinsuliną, reguliuoja ląstelių dauginimąsi ir pasižymi į insuliną panašiu poveikiu.

IGF inicijuoja folikulų augimą kiaušidėse (Findlay et al., 1996), dėl jo poveikio keičiasi folikulų theca sluoksnio ląstelių jautrumas LH ir FSH. Ovuliacinio folikulo išsivystymas irgi yra siejamas su IGF. Dėl gonodotropinų poveikio formuodamasis folikulas gamina IGF, kuris inicijuoja kitų folikulų išsivystymą. Transformuojantis IGF dalyvauja geltonkūnio regresijos procese ir stimuliuoja fibroblastų išbuojimą geltonkūnyje. Ankstyvojoje embriogenezėje IGF yra atsakingas už embrionų blastocistų vystymosi stadiją (Smith et al., 2005). Gimdos susitraukimo mechanizme dalyvaujantis IGF ir insulino hormonai veikia endometriumo ir miometriumo ląsteles bei stimuliuoja jų proliferaciją. IGF pakeičia arachidono rūgštį į prostaglandinus, kurie taip pat stimuliuoja gimdos susitraukimą. Prostaglandinai pasižymi parakriniu veikimu (Yao et al., 2010).

Neuroendokrininėje lytinio ciklo reguliacijoje svarbią vietą užima šviesa. Nuo apšvietimo intensyvumo priklauso pasmegeninės liaukos atsakas į gonadotropinus atpalaiduojančio faktoriaus (GnRH) poveikį.

Akies tinklainės pagautas šviesos signalas yra perduodamas į pagumburį ir į kankorėžinę liauką. Kankorėžinė liauka kontroliuoja fotoperiodiškumą, išskirdama hormoną melatoniną. Melatoninas yra svarbus organizmo biologinis reguliatorius, atsakingas už organizmo cirkadinį ciklą ir organizmo lytinį formavimąsi. Slopindamas GnRH sintezę, jis reguliuoja reprodukcinę funkciją per pagumburį. Liauką sudaro penkių tipų ląstelės, tarp kurių pagrindinėmis ląstelėmis laikomi pinealocitai, gaminantys

melatoniną. Žinduolių kankorėžinės liaukos informaciją priima per regos nervą (Macchi, Bruce, 2004). Melatoninas reguliuoja lytinių liaukų aktyvumą, slopindamas FSH sekreciją (Berlinguer et al., 2009), slopina ląstelių, sintetinančių gonadotropinius, fermentinį aktyvumą (Balik et al., 2004). Šis hormonas stimuliuoja oksitocino sekreciją ir skatina progesterono gamybą. Kiaušidėse melatoninas slopina estrogeno receptoriaus  $\alpha$  ir progesterono receptoriaus  $\beta$  raišką (Chuffa et al., 2011). Keičiant šviesos intensyvumą galima pagerinti produktyvumą ir reprodukcinę funkciją.

Pubertiniu laikotarpiu (iki lytinio subrendimo) galvijams yra svarbios prieinkstinės liaukos. Esant lytinių liaukų nepakankamumui, jie perima jų endokrininę funkciją. Tinklinėje prieinkstinių liaukų zonoje yra gaminami lytiniai hormonai androgenai ir estrogenai, kurie svarbūs brendimo metu antrinių lytinių požymių ir tešmens išsivystymui, moduliuoja karvės elgesį rujos metu, slopina folikulų brendimą ir skatina progesterono sekreciją.

Didžiausią įtaką reprodukcinėms funkcijoms turi hipofizė ir lytinės liaukos, tai yra pirminiai neuroendokrininiai reguliavimo centrai (Hafez, Hafez, 2000).

Pagumburio–hipofizės ašis yra viena svarbiausių neuroendokrininės sistemos dalių, tai vienas funkcinis vienetas, reguliuojantis lytinį ciklą per kiaušides (Short et al., 1990). Ši ašis sujungia neuroendokrininę ir endokrininę sritis per portalinę kraujotaką.

Pagumburis yra trečio smegenų skilvelio srityje tarp optinės chiazmos ir speninių kūnų. Ši smegenų vieta yra nervinė jungtis tarp pagumburio ir užpakalinės pasmegeninės liaukos dalies, kartu tai yra kraujagyslinė jungtis tarp pagumburio ir pasmegeninės liaukos priekinės dalies. Hipofizės veikla yra priklausoma nuo pagumburio ir hipofizės anatominių struktūrų tarpusavio sąveikos. Ji yra smegenų pagrindo kaulinėje kišenėje po pagumburiu, tarpusavyje jas jungia nervinės skaidulos ir kraujagyslės. Anatomiškai liauka skirstoma į tris dalis: priekinę (adenohipofizę), tarpinę ir užpakalinę (neurohipofizę) (Eiler, 2004). Užpakalinė hipofizės dalis neturi hormonų sekretuojančių ląstelių, todėl vazopresinas ir oksitocinas sintezuojami supraoptiniuose pagumburio branduoliuose, bet į kraują juos išskiria neurohipofizė. Reguluojant lytinę sistemą dalyvauja priekinė hipofizės dalis, gimda ir kiaušidės. Priekinė hipofizės dalis sekretuoja 6 peptidinius hormonus: augimo hormonus (GH), skydliaukę stimuliuojantį hormoną (TSH), adrenokortikotropinį hormoną (ACTH), FSH, LH ir prolaktiną (Crowe et al., 1998). Hormonai yra sintetinami iš baltyminių hormonų, pirmiausia produkuojamas preprohormonas, vėliau iš prepropresofizino – vazopresinas, o iš preprooksifizino – oksitocinas. Abu hormonai saugomi sekrecinėse granulėse ir sekretuojami sujungti su baltymu.

Lytinės funkcijos reguliavimui svarbiausi yra hipofizės išskiriami gonadotropinai – LH ir FSH. Lytinio ciklo reguliacija per šią ašį prasideda, kai steroidinių hormonų yra didelė koncentracija, o hormonų LH ir FSH koncentracija maža (Crowe et al., 1998). Lytinio ciklo pabaigoje, maksimaliai padidėjus steroidinių hormonų koncentracijai, suaktyvėja pagumburys (Nett et al., 1987; Yavas, Walton, 2000), kurio pagrindinė funkcija yra smegenų pagrindo ląstelėse gaminti GnRH (Schubert, 1997). Pagumburio aktyvumą kontroliuoja aukštesnieji nerviniai centrai (Moenter et al., 1992). Po GnRH transportavimo iš pagumburio į hipofizės liauką, GnRH prisijungia prie savo su G-baltymu susieto receptoriaus ant gonadotropinės ląstelės paviršiaus. Ši jungtis išlaisvina intraląstelinį kalcį, aktyvuojantį proteinkinazę, bei FSH ir LH iš hipofizės (Kakar et al., 1993), veikiančius kiaušidžių folikuluose bręstančius ovocitus.

Hormonus, dalyvaujančius lytiniame cikle, išskiria ne tik hipofizė, bet ir kiaušidės (progesteroną (P4), estradiolį (E2) ir inhibiną) bei gimda (prostaglandiną (PGF<sub>2α</sub>)) (Crowe et al., 1998; Mapletoft, 2006; Crowe, Mullen, 2013).

### **1.5. Folikulų augimas kiaušidėse**

Karvės kiaušidžių funkcionalumą lemia kiaušidžių dydis ir folikulų augimo tempas, reguliuojamas hormonų, augimo faktoriaus ir ląstelių tarpusavio sąveikos. Kiaušidžių funkcija yra dvejopa. Pirmoji – ovocito gamyba, antroji – steroidinių hormonų gamyba. Steroidiniai hormonai užtikrina sėkmingą lytinių takų išsivystymą ir palengvina embrionų implantaciją (Hafez, Hafez, 2000).

Svarbiausi kiaušidžių dariniai – folikulai ir geltonkūniai, yra atsakingi už steroidų (estrogenų ir progesteronų) sintezę. Kiaušidėje augantys folikulai yra skysčio pripildytos struktūros (pūslelės), apsuptos ląstelių sluoksnio, kurį iš vidaus sudaro granuliozinių, o iš išorės – endokrininių ląstelių sluoksnis (Fricke, 2002). Folikulų augimas ir brendimas priklauso nuo nuoseklios subląstelių ląstelių ir molekulių įvairių komponentų transformacijos folikuluose: ovocito, vidinių ir išorinių ląstelių (Hafez, Hafez, 2000). Endokrininių ląstelių sluoksnis yra svarbus gaminant androgenus, kurie reikalingi estrogenų biosintzei (Magoffin, 2005). Granuliozinių ląstelių sluoksnis gamina inhibiną. Manoma, kad inhibinas slopina FSH išskyrimą ir mažesnių folikulų vystymąsi (silpnina superovuliaciją) (Žilaitis ir kt., 2013). Folikuluose esantis skystis atlieka svarbų vaidmenį fiziologiniuose, biocheminiuose ir metaboliniuose

branduolio ir citoplazmos brendimo procesuose, bręstant ovocitams. Lytinio ciklo metu folikulinis skystis skatina folikulų augimą ir steroidogenezę, ovocito brendimą, ovuliaciją ir ovocito pernešimą į kiaušintakį, paruošia folikulo tolesnį vartimą į geltonkūnį, o skystyje esantys stimulatoriai ir inhibitorinės medžiagos reguliuoja folikulinį ciklą (Hafez, Hafez, 2000).

Pagal sandarą ir dydį folikulai brendimo metu skirstomi į primordialinius, pirminius ir antrinius, o pagal erdvės formavimą skirstomi į preantralinius ir antralinius. Primordialiniai folikulai nesidaugina, jie virsta pirminiais, kurių vystymasis sustoja iki tol, kol telyčia subręsta. Po subrendimo prasideda pirminių folikulų vystymasis į antrinius (preantralinius ir antralinius). Antralinis folikulas vadinamas Grafo folikulu, jo viduje yra visavertis subrendęs ovocitas.

Augant folikulams abiejuose ląstelių sluoksniuose veikiant hormonams vyksta ląstelių proliferacija ir diferenciacija. Šiuos procesus reguliuoja gonadotropinai, IGF, o folikulo vystymąsi, ovocito kokybę, taip pat ir apsisvaisinimą įtakoja daugelis aplinkos faktorių, tokių kaip šėrimas ir kt. (Garnsworthy, Webb, 1999).

Folikulų ir ovocitų vystymasis atsinaujina dėl lytinių hormonų įtakos (Glidewell-Kenney et al., 2007). Hormonų sekrecijos kombinacijos ir medžiagų apykaitos derinys palaiko tinkamą hormonų pusiausvyrą per folikulinę ir geltonkūnio ciklo fazes. Priešovuliacinis folikulas ir vėliau susidaręs geltonkūnis yra pagrindiniai kiaušidžių dariniai, reguliuojantys atitinkamą estradiolio ir progesterono sekreciją (Wiltbank et al., 2006).

Gonadotropiniai hormonai LH ir FSH reguliuoja folikulų vystymosi procesus. Periodiškai pakylanti FSH koncentracija nulemia antrinių folikulų kiekį, patenkantį į folikulinę bangą. Cirkuliuojančio FSH kiekis yra slopinamas neigiamu grįžtamuoju ryšiu. Naujos folikulinės bangos folikulai išskiria estradiolį ir inhibiną, todėl sumažina FSH kiekį ir apsaugo nuo naujos folikulinės bangos formavimosi. Dominuojantys folikulai turi didesnes estradiolio koncentracijas negu bręstantys folikulai, tai yra vienas iš skirtumų tarp jų, užtikrinantis, kad neprasidės nauja folikulinė banga. Augant dominuojančiam folikului vyksta svarbūs pokyčiai. Jis tampa neapiklausomas nuo FSH, o didėjantis išskiriamo estradiolio kiekis teigiamu grįžtamuoju ryšiu skatina hipofizę išskirti LH. Padidėjusi LH koncentracija sukelia ovuliaciją. Po ovuliacijos kiaušidėje trūkusio folikulo vietoje formuojasi geltonkūnis, kurio liuteininėse ląstelėse pradedamas gaminti progesteronas, slopinantis GnRH ir LH sekreciją ir naujų folikulų ovuliaciją (Roche et al., 1992; Rasby, Deutscher, 2000; Stevenson, 2001; Hall et al., 2009). Jei karvė neapsivaisina, geltonkūnis nustoja gaminti progesteroną ir regresuoja. Lytinio ciklo metu vykstanti geltonkūnio regresija vadinama liuteolize. Jos mechanizmas siejasi su prostaglandiniais,

kuriuos išskiria gimdos endometriumas. Po geltonkūnio regresijos išsiskiria daugiau GnRH ir LH, vyraujantis folikulas pradeda intensyviau augti, o kiaušidės – gaminti estrogenus, skatinančius rudos požiūmų atsiradimą. Padidėjus FSH ir LH kiekiams įvyksta ovuliacija (Roche et al., 1992; Hall et al., 2009), kurios metu ovuliuoja dominuojantis folikulas arba progesterono fone vyksta jo atrezija. Natūralaus lytinio ciklo metu gali ovuliuoti tik paskutinės bangos folikulai, kai suardomas geltonkūnis ir sumažėja progesterono koncentracija kraujyje (Hafez, Hafez, 2000).

Dėl FSH koncentracijos pokyčių (padidėjimo arba sumažėjimo) kraujyje folikulai kiaušidėse auga bangomis iki lytinio subrendimo, lytinio ciklo metu ir veršingumo laikotarpiu. Veršingumo metu besiformuojantys folikulai palaiko reikiamą estrogenų koncentraciją ir sąlygoja karvės elgseną (Žilaitis ir kt., 2013). 95 % lytinių ciklų metu kyla dvi arba trys folikulinės bangos, besibaigiančios dominuojančio folikulo išsivystymu (Adams, 1999; Ball, Peters, 2004). Pirmasis dominuojantis folikulas susiformuoja tarp 7–15 paros po apsiveršiavimo (Crowe, 2008).

Vidutiniškai karvių lytinis ciklas trunka 21 parą, bet gali varijuoti tarp 18–24 parų, tai priklauso nuo folikulinių bangų skaičiaus. Karvių lytinis ciklas, kurio metu kyla trys folikulinės bangos, paprastai trunka 20–24 paras, o karvių su dvejomis folikulinėmis bangomis lytinis ciklas tęsiasi 18–20 parų (Bleach et al., 2001). Folikulų augimo bangos vyksta 7–8 parų intervalu per visą lytinį ciklą, kiekvienoje bangoje subręsta ovuliuoti gebantis dominuojantis folikulas, kuris būdamas didžiausiu pradeda slopinti mažesnių folikulų augimą (Henschel, 2001). Kiekvienos bangos metu pradeda augti apie 20–50 folikulų, iš kurių 3–6 folikulai užauga iki 4–5 mm skersmens, tačiau augimo bangos pabaigoje lieka tik vienas, jis tampa vyraujančiu, bet kiaušialąstės nesubranda ir greitai suyra (Žilaitis ir kt., 2013).

Kiekvienos folikulinės bangos metu vyksta folikulų susitelkimas, atranka, dominavimas ir išnykimas (atrezija) (Pierson, Ginther, 1988; Binelli et al., 1999; Beg et al., 2001). Folikulinė banga prasideda nuo apie 4,0 mm diametro susitelkusių folikulų, augančių kartu iki 5–7 mm. Pasiekęs tokį dydį, vienas folikulas pradeda greičiau už kitus augti ir tampa vyraujančiu, o kiti nustoja augę ir pamažu regresuoja (Adams et al., 1993; O'Connor, 1993). Vyraujantis folikulas vidutiniškai užauga nuo 4,0 iki 8,5 mm, o subordinarinis (antras pagal dydį) – iki 7,5 mm (Gibbons et al., 1999). Vyraujantis folikulas morfologiškai ir funkciškai dominuoja maždaug iki 11 ciklo paros. Vėliau jis pradeda regresuoti (11–14 parą), ir prasideda antroji folikulų augimo banga (Yang, Rajamahendran, 2000). Antroji banga prasideda maždaug 10 parą po ovuliacijos, o papildoma, trečioji, esant trijų bangų ciklui, prasideda 16 parą po ovuliacijos (Ginther et

al., 1996). Lytinio ciklo metu, kylant antrai ir trečiai folikulų augimo bangai, susidaro Grafo folikulas, kuris didumu pranoksta iki jo besiformavusius ir subrandina visavertį ovocitą (Ball, Peters, 2004). Po ovuliacijos, išnykus dominuojančiam folikulai, jo vietoje formuojasi geltonkūnis. Geltonkūnis išsivysto per 2–3 paras po ovuliacijos ir gali užaugti iki 30 mm skersmens, o regresuoti pradeda apie 17–18 ciklo parą (Acosta et al., 2000).

Lytinio ciklo metu ovocito vystymasis ir jo brendimas yra labai svarbus karvių reprodukcinėi funkcijai. Ovocito brendimas susideda iš dviejų etapų: augimo periodo ir finalinio branduolio, bei citoplazmos ruošimosi apvaisinimui ir normaliam vystymuisi (Hafez, Hafez, 2000). Ovocito brendimas prasideda vystantis antraliniam folikulai. Paskutinės folikulų augimo bangos metu subrandinamas antrinis ovocitas, ovuliacijos metu virstantis į visavertį tretinį ovocitą (Sa Filho et al., 2010). Galutinis branduolio ir citoplazmos ruošimasis apvaisinimui ir normaliam vystymuisi prasideda paskutinėje ovocito formavimosi fazėje – II mejozėje. Šie procesai normaliai nevyksta be gonadotropinių hormonų, slopinančių miotinių inhibitorinių faktorių gamybą vidinėje ląstelių pusėje, kurių dėka folikulų sluoksnyje vyksta metabolinės modifikacijos. Branduolio brendimas yra vienas iš pagrindinių ovocito brendimo etapų (Ball, Peters, 2004).

### **1.6. Superovuliacijos efektyvumą lemiantys veiksniai**

Kiaušidžių atsakas į stimuliaciją daugybiniu folikulų augimu ir visavertišku jų subrendimu vadinamas superovuliacija (Mapletoft et al., 2002).

Dauguma mokslininkų sutaria, kad kintamą kiaušidžių atsaką į stimuliaciją hormoniniais preparatais įtakoja labai daug faktorių, apimančių hormoninių preparatų parinkimą, kiaušidžių būseną prieš superovuliaciją, mažų folikulų skaičių, atsirandantį kiekvienos folikulinės bangos pasirodymo metu (Cushman et al., 1999), dominuojančio folikulo buvimą ar nebuvimą naudojant gonadotropinus, geltonojo kūno buvimą ar nebuvimą, naudojant FSH (Kim et al., 2001), reprodukcijos istoriją, mitybą, gyvūno laikymo sąlygas, sveikatingumą (Mapletoft et al., 2002) bei daugkartinį superovuliacijos naudojimą (Benyei et al., 2004). Šie veiksniai itin svarbūs superovuliacijos efektyvumui ir sėkmingai embrionų transplantacijai.

Pagal Hasler (2014) svarbiausi veiksniai superovuliacijos rezultatams yra donorių veislė, amžius, reprodukcinė būklė ir reprodukcijos istorija,

superovuliacijos protokolo veiksmingumas, klimatas, šėrimas ir kiti išoriniai veiksniai. Pagal šį autorių ne mažiau svarbi yra ir donorių apvaisinimui naudojamos spermos kokybė, sėklinimo laikas ir sėklintojo patirtis. Stroud ir Hasler (2006) nuomone, superovuliacijos rezultatai priklauso nuo transplantacijos specialistų turimos patirties atrenkant donores, donorių genetikos, šėrimo, amžiaus, laktacijos intensyvumo, laikotarpio po apsiveršiavimo, spermos kokybės ir sėklinimo laiko.

Vyraujant nuomonei, kad donorės atsakas į kiaušidžių stimuliaciją yra paveldimas, galvijų bandų selekcininkai ilgus metus veislei palikdavo telyčaites, gautas iš donorių, produkavusių didelį skaičių transplantacijai tinkamų embrionų. Tačiau Tonhati su kolegomis (1999) aprašė, kad išanalizavus 5387 embrionų išgavimo atvejus Brazilijoje nustatytas žemas superovuliacijos atsako paveldimumo koeficientas – 0,03. Autoriai informavo, kad superovuliacijos atsakas negali būti prognozuojamas ir pagal ankstesnius plovimų rezultatus, nes superovuliacijos rezultatų pasikartojimo tikimybės koeficientas – 0,13. Panašius rezultatus paskelbė ir Liboriussen (1994), kuris nustatė, kad pagal išplaunamų embrionų skaičių daniškų veislių karvių paveldimumo koeficientas yra lygus 0,15.

Teiginys, kad iš mėsinių galvijų yra gaunamas didesnis skaičius transplantacijai tinkamų embrionų, nei iš pieninių galvijų veislių yra patvirtintas žemiau aprašytais faktais. Hasler su kolegomis (1983) pranešė, kad iš 1000 melžiamų pieninių karvių buvo gauta vidutiniškai 5,1 embriono, o Looney (1986) nustatė, kad iš 2048 stimuliuotų mėsinių galvijų vidutiniškai buvo išplauta 6,6 embriono. Tačiau yra paskelbta ir prieštaraujančių šiems faktams tyrimo rezultatų. Putney su kolegomis (1988) pranešė, kad eksperimento metu iš pieninių telyčių buvo gautas didesnis embrionų skaičius nei iš mėsinių, bet lyginant pienines ir mėsines karves skirtumo tarp embrionų skaičiaus nebuvo. Hasler su kolegomis (1987) atlikto tyrimo metu buvo nustatyta, kad iš vyresnių nei 15 metų karvių buvo išskirta mažiau embrionų, nei iš jaunesnių.

Pastaruoju metu pradėta plačiai tyrinėti, koks ryšys yra tarp kiaušidžių struktūros prieš superovuliaciją ir jų atsako į stimuliaciją hormoniniais preparatais (Grizelj et al., 2013).

Kiaušidžių dydis siejasi su jų funkciniais dariniais – folikulais ir geltonkūniais (Cushman et al., 2010). Vykdam superovuliaciją yra svarbu, kad karvių kiaušidės būtų jautrios egzogeniniams gonadotropinams. Jautrumas GnRH yra nustatomas pagal progesterono koncentraciją, todėl svarbu nustatyti geltonkūnio dydį, įtakojantį progesterono koncentraciją (Kayacik et al., 2005). Karvės, kurių progesterono koncentracija yra aukštesnė, rodo aktyvesnį atsaką į superovuliaciją lyginant su karvėmis, kurių progesterono koncentracija yra žema (Kudlač et al., 1991). Kadangi

geltonkūnis didžiausias būna 7–16 lytinio ciklo parą, todėl tokiu laiku būtų palankiausia pradėti stimuliaciją egzogeniniais gonadotropiniais.

Karvių kiaušidžių funkcija priklauso nuo pirminių (antralinių) folikulų buvimo (Silva-Santos et al., 2013). Nustatyta, kad kiekvienos naujos folikulinės bangos metu prasideda prieš tai buvusios folikulinės bangos folikulų regresija dėl mažėjančios FSH koncentracijos, kurią mažina estradiolio sekrecija ir inhibinai, o ypač – dominuojantis folikulas (Adams et al., 1992, 1993).

Ankstesnių tyrimų metu buvo keliama hipotezė, kad kiaušidžių stimuliacija nepadidina folikulų skaičiaus bangoje, bet pagreitina mažesnių folikulų augimą (Adams et al., 1993). Pagal Bungartz ir Niemann (1994), didelis skaičius potencialių primordialinių folikulų donorių kiaušidėse prieš superovuliaciją yra siejamas su geresniu superovuliacijos atsaku. Atliktų tyrimų metu nustatyta, kad ovuliacijų skaičius po superovuliacijos priklauso nuo folikulų skaičiaus, kurie į stimuliaciją atsako proliferacija, diferenciacija ir ovuliacija per 120 valandų periodą (Kanitz et al., 2002).

Per parą augančio folikulo skersmuo padidėja nuo 1 iki 2 mm, normalų išsivysčiusio folikulo dydį jis pasiekia per 2–3 paras. Nustatyta, kad mažiems folikulams reikalingas FSH, kuris skatintų tolimesnį jų vystymąsi. Manoma, kad maži 1 mm skersmens folikulai jautrūs egzogeniniam FSH, jo veikiami folikulai pradeda visavertį vystymąsi iki pilno subrendimo (Adams et al., 2008). Buvo iškelta hipotezė, kad egzogeninis FSH gali priversti šiuos folikulus užaugti iki 3 ar 4 mm skersmens, dėl šios hipotezės patvirtinimo buvo taikomi superovuliacijos protokolai, kurie įrodytų gaunamų embrionų skaičiaus padidėjimą naudojant įvairius gonadotropinų preparatus ir jų kombinacijas (Bo et al., 2008).

Burns ir kitiems mokslininkams (2005) paskelbus, kad kiekvienoje naujoje folikulų augimo bangoje karvėms superovuliacijos metu gali pradėti augti, o vėliau ir ovuliuoti vidutiniškai nuo 8 iki 56 naujų folikulų, tampa aišku, kad ultragarsinio kiaušidžių tyrimo metu identifikavus didelį kiaušidėse pradedančių augti folikulų skaičių turinčias donores, galima padidinti superovuliacijos efektyvumą. Bo ir Mapletoft (2014) savo mokslinėje apžvalgoje paskelbė, kad geriausių embrionų išeigos rezultatų galime tikėtis, jei ultragarsinio tyrimo metu bus atrinktos donorės, kurių kiaušidėse naujos folikulų augimo bangos metu pradės augti ne mažiau kaip 25 nauji folikulai. Tai rodo, kad ultragarsinis kiaušidžių tyrimas atrenkant donores superovuliacijai yra svarbus ir reikšmingas (Amiridis et al., 2006), nes suteikia galimybę atrinkti superovuliacijai tinkamas donores.

Atsižvelgiant į tai, buvo pradėta taikyti superovuliacijos protokolus, inicijuojančius ir skatinančius mažų folikulų tolesnį vystymąsi.

### 1.7. Superovuliacijos protokolų tobulinimas

Galvijų embrionų transplantacijos pradžioje kiaušidžių stimuliacija superovuliacijos metu buvo vykdoma kumelių chorioniniu gonadotropinu (eCG), t. y. glikoproteinų kompleksu, aktyvinančiu FSH ir LH, kuris karvių kraujyje cirkuliuoja apie 10 parų. Ilgas skilimo laikas (skilimo pusperiodis – 40 val.) sąlygoja nenutrūkstamą kiaušidžių stimuliaciją, skatina folikulų ovuliaciją, stimuliuoja endokrinines funkcijas ir embrionų transplantacijos specialistų buvo palankiai vertinamas dėl vienkartinės injekcijos superovuliacijai sukelti (Murphy, Martinuk, 1991).

Pagal pirmuosius superovuliacijos protokolus rekomenduojamos eCG dozės buvo 2000–3000 TV (Hafez et al., 1963), nors dažniausiai į raumenis leidžiama 2500 TV (Mapletoft et al., 2002). Iki prostaglandinų (PGF<sub>2α</sub>) preparatų atsiradimo pirmieji superovuliacijos protokolai buvo sinchronizuojami atsižvelgiant į natūralią lytinio ciklo eigą. Kiaušidžių stimuliacijai eCG buvo leidžiamas 16 lytinio ciklo parą (prasidėjus geltonkūnio liuteolizei), 19 ir 20 paromis donorėms buvo leidžiama po 10 mg estradiolio-17β, o 21 lytinio ciklo parą ovuliacijai sukelti – 2000 TV žmonių chorioninio gonadotropino (hCG) (Hafez et al., 1963).

1970 metais veterinarinėje praktikoje pradėjus naudoti PGF<sub>2α</sub> preparatus, reguliuojančius lytinio ciklo trukmę, kiaušidžių stimuliaciją eCG buvo galima pradėti įvairiu lytinio ciklo metu. Todėl imta tobulinti superovuliacijos protokolus, bandant nustatyti optimaliausią PGF<sub>2α</sub> leidimo laiką. Elsden ir kiti mokslininkai (1974) informavo, kad geresni superovuliacijos rezultatai buvo gauti, kai PGF<sub>2α</sub> donorėms buvo leidžiamas 48 val. po eCG injekcijos, lyginant su pirmųjų superovuliacijos protokolų efektyvumu, kai eCG buvo leidžiamas 16 lytinio ciklo parą. Greitai embrionų transplantacijos praktikai pastebėjo, kad geresni superovuliacijos rezultatai gaunami, kai kiaušidžių stimuliacija eCG pradedama lytinio ciklo viduryje. Šias prielaidas patvirtino Phillippo ir Rowson (1975), paskelbę, kad geriausius superovuliacijos rezultatus gavo, kai kiaušidės su eCG buvo pradėtos stimuliuoti 8–12 lytinio ciklo parą. Ginther su kolegomis (1989) aprašė, kad 8–12 parą po rujos prasideda nauja folikulų augimo banga, todėl šis laikas yra tinkamas pradėti kiaušidžių stimuliaciją pagal superovuliacijos protokolus.

Elsden ir kiti mokslininkai (1978) paskelbė, kad geresnius superovuliacijos rezultatus gavo, kai kiaušidės buvo stimuliuotos neišgrynintu hipofizės ekstraktu, kurio sudėtyje buvo FSH ir 20 % LH, nei su eCG. Efektyvesnį FSH poveikį už eCG superovuliacijos rezultatams gavo ir Monniaux su kolegomis (1983). Tačiau superovuliacijos protokolai

stimuliuojant kiaušides FSH nebuvo populiarūs, nes šio gonadotropino skilimo pusperiodis buvo 5 valandos (Laster, 1972), todėl norint sukelti efektyvią superovuliaciją FSH reikėdavo leisti 2 kartus per parą (Looney et al., 1981; Monniaux et al., 1983; Walsh et al., 1993).

Greitai mokslininkai pastebėjo neigiamą eCG poveikį: dėl ištęsto donorių kiaušidžių stimuliacijos poveikio embrionų plovimo metu kiaušidėse buvo randami dideli neovuliacijai folikulai ir mažiau išplaunama kokybiškų embrionų (Gonzalez et al., 1994; Mikel Jensen et al., 1982; Moor et al., 1984; Saumande et al., 1978; Schams et al., 1978). Iš neovuliacijai folikulų susiformuodavo ilgai negyjančios pavienės ar daugybinės kiaušidžių cistos, dėl kurių nusitęsėdavo kitos superovuliacijos pradžia arba donorės sėklinimo laikas. Šią problemą bandyta spręsti į veną leidžiant antikūnius prieš eCG pirmo sėklinimo metu, 12–18 val. nuo pirmų rujos požymių pasirodymo (Dieleman et al., 1993; Gonzalez et al., 1994). Tačiau 1990 metais buvo nutraukta tokių antikūnių preparatų gamyba, todėl mokslininkai pradėjo tobulinti superovuliacijos protokolus kiaušidžių stimuliacijai naudodami kitus, mažesnę šalutinį poveikį duodančius, gonadotropinus.

McGowan su kolegomis (1985) tyrimo metu gavo panašius superovuliacijos rezultatus stimuliuodami donorių kiaušides kiaušių hipofizės ekstraktu (FSH ir LH) ir žmonių menopauzės gonadotropinu (hmG), tačiau embrionų transplantacijos specialistai nenaudojo hmG dėl didelės kainos.

Pagal šių dienų superovuliacijos protokolus daugeliu atvejų kiaušidžių stimuliacija vykdoma iš hipofizės ekstrakto pagamintais preparatais, kurių veiklioji medžiaga yra hipofizės gonadotropinai FSH ir LH. Siekiant pratęsti liuteininę lytinio ciklo fazę iki pageidaujamos datos ir užtikrinti, kad donorė nesurijotų anksčiau laiko, superovuliacijos protokoluose yra numatoma į makštį aplikuoti intravagininį implantą, pastoviai išskiriantį progesteroną (Bo et al., 2008; Mapletoft, Bo, 2012). Po 48 ir 60 val. nuo kiaušidžių stimuliacijos pradžios donorėms leidžiamas  $\text{PGF2}_\alpha$ , siekiant sukelti liuteolizę, o po 72 val. nuo stimuliacijos pradžios išimamas intravagininis implantas. Rujos požymiai atsiranda vidutiniškai 48 val. po pirmos  $\text{PGF2}_\alpha$  injekcijos, o dar po 24–36 val. įvyksta folikulų ovuliacija (Bo et al., 2006; Mapletoft, Bo, 2012). Sėklinama du kartus: 12 ir 24 val. po pirmų rujos požymių pasirodymo (Mapletoft et al., 2002).

Dauguma šių dienų mokslininkų, siekiančių pagerinti superovuliacijos efektyvumą, kuria superovuliacijos protokolus, siekdami sinchronizuoti kiaušidžių stimuliacijos pradžią ir folikulų augimo bangos kilimą. Mokslinis pagrindimas tokiai tyrimų kryptčiai atsirado keletui tyrėjų (Armstrong, 1993; Adams et al., 1994; Nasser et al., 1993) nustačius, kad kiaušidžių stimuliaciją gonadotropiniais pradėjus 1 parą anksčiau ar 1 parą vėliau nei

prasidėjo folikulų augimo bangos kilimas, superovuliacijos efektyvumas ženkliai sumažėja. Pagal Bo ir Mapletoft (2014), tik 20 % natūralaus lytinio ciklo parų (4–5 paros) yra tinkamos pradėti superovuliaciją, jei norima kiaušidžių stimuliaciją pradėti folikulų augimo bangos pradžioje. Dėl šios priežasties į superovuliacijos protokolus įtraukiamos papildomos procedūros ar veiksniai, leidžiantys kontroliuoti ir sinchronizuoti naujų folikulų augimo bangų kilimą (Mapletoft, Bo, 2012).

Folikulų augimo bangų sinchronizavimas prieš superovuliaciją gali būti atliekamas mechaniškai pašalinant dominuojantį folikulą (Bergfelt et al., 1997) arba panaudojant estradiolį derinyje su progestinu (Bo et al., 1995), arba GnRH (Kohram et al., 1998).

### **1.8. Dominuojančio folikulo pašalinimas**

Vienas iš variantų sinchronizuoti folikulų augimo bangos kilimą yra dominuojančių folikulų pašalinimas naudojant per makštį įvedamą ultragarsu valdomą kiaušidžių folikulų aspiravimo zondą (Bungartz, Niemann, 1994; Bergfelt et al., 1994).

Nustatyta, kad kiaušides sėkmingai galima stimuliuoti, jei jose nėra didelių folikulų. Dominuojantys folikulai parakriniškai veikia likusių folikulų populiaciją kiaušidėje, išskiria folistatiną ir inhibiną, kurie trikdo mažesnių folikulų vystymąsi. Remiantis mokslininkų duomenimis, iš karvės gaunama daugiau embrionų, kai nėra dominuojančio folikulo superovuliacijos pradžioje (Heleil, El Deeb, 2010).

Superovuliacijos metu, prieš pradedant stimuliuoti kiaušides, siūloma aspiruoti didesnius folikulus (Guilbault et al., 1991; Bungartz, Niemann, 1994). Keletas autorių praneša, kad stimuliacijos dieną didelių folikulų buvimas ženkliai sumažina superovuliacijos atsaką, o pašalinus dominuojantį folikulą superovuliacijos efektyvumas padidėja (Kim et al., 2001; Shaw, Good, 2000). Nustatyta, kad pašalinus didžiuosius folikulus gaunami vienodi rezultatai kaip ir pašalinus visus folikulus, kurių skersmuo didesnis nei 5 mm (Baracaldo et al., 2000).

Prieštaraujančius teiginius dėl dominuojančių folikulų pašalinimo siekiant pagerinti superovuliacijos rezultatus paskelbė Bergfelt su kolegomis (1997) ir Diaz su kolegomis (2001). Šių mokslininkų atliktų bandymų metu nepavyko įrodyti teigiamo efekto superovuliacijos atsakui pašalinus dominuojantį folikulą. Buvo padaryta išvada, kad stimuliacijos pradžioje leistas egzogeninis FSH panaikino bet kokią sistemiskai slopinantį persistuojančio folikulo poveikį.

Kadangi dominuojančio folikulo pašalinimas yra susijęs su naujos folikulinės bangos pasirodymu, todėl tai gali būti tinkamas būdas sinchronizuoti naujos folikulinės bangos pasirodymą superovuliacijos protokoluose (Baracaldo et al., 2000).

Mažų antralinių folikulų skaičius tuo metu, kai atliekamas dominuojančio folikulo pašalinimas, yra svarbiausias veiksnys, lemiantis sėkmingus superovuliacijos rezultatus, nes tarp jų, išplautų ir transplantacijai tinkamų embrionų skaičiaus nustatyta patikima koreliacija (Durocher et al., 2006).

Pradiniuose tyrimuose buvo šalinami visi didesni nei 5 mm folikulai (Bergfelt et al., 1997), tačiau vėliau pastebėta, kad pašalinami gali būti du didžiausi dominuojantys folikulai (Baracaldo et al., 2000). Daugelio atliktų tyrimų metu nustatyta, kad dominuojančio folikulo pašalinimas paspartino kitos folikulinės bangos pasirodymą (Adams et al., 1992, 1993). Buvo pranešama, kad norint optimizuoti superovuliacijos atsaką, kiaušidžių stimuliacija turi būti pradedama folikulų bangos pasirodymo metu (Nasser et al., 1993; Adams, 1994). Tačiau Bo su kolegomis (2006) pranešė, kad superovuliacija, po naujos folikulinės bangos pasirodymo pradėta 1–2 paromis vėliau, buvo labiau efektyvi. Shaw ir Good (2000) nustatė ryšį tarp dominuojančio folikulo pašalinimo ir superovuliacijos atsako. Duomenys buvo surinkti iš 171 tiriamos karvės (1 grupė), kurioms nebuvo pašalintas dominuojantis folikulas, ir iš 1214 karvių (2 grupė), kurioms dominuojantis folikulas buvo pašalintas prieš pradedant stimuliaciją gonadotropiniais. Rezultatai parodė, kad didesnis embrionų skaičius buvo gautas karvių grupėje, kurioje buvo pašalintas dominuojantis folikulas (vid. 12,1 embriono antroje grupėje ir 10,5 embriono pirmoje). Skirtumas buvo pastebimas ir pagal transplantacijai tinkamų embrionų skaičių. Toje karvių grupėje, kurioje buvo pašalintas dominuojantis folikulas, gauta vid. 6,5 transplantacijai tinkamo embriono, o kontrolinėje grupėje – 5,3. Šie duomenys parodė, kad kiaušidžių stimuliacijos pradėjimas po dominuojančio folikulo pašalinimo padidina embrionų produkciją.

Patel ir Roy (2013) atlikto tyrimo metu grupėje karvių, kurioms buvo pašalintas dominuojantis folikulas, buvo gauta vidutiniškai po 6,00 (skirtumas labai reikšmingas) transplantacijai tinkamus embrionus, kontrolinėje grupėje iš karvės buvo išplauta vidutiniškai 2,88 transplantacijai tinkamo embriono.

Dominuojančio folikulo pašalinimas 24 valandas prieš pradedant kiaušidžių stimuliaciją pagerino superovuliacijos efektą, embrionų kokybę ir padidino gyvybingų embrionų skaičių. Mutha Rao ir kiti mokslininkai (2009) informavo, kad grupėje karvių, kurioms buvo pašalintas dominuojantis folikulas, buvo nustatyta vidutiniškai 15,08 ovuliovusio folikulo ir vidutiniškai 13,53 ovuliovusio folikulo kontrolinėje grupėje,

kurios karvėms nebuvo pašalintas dominuojantis folikulas. Amiridis su bendraautorais (2006) paskelbė, kad ovuliacijos požymius karvių grupėje, kurioje buvo pašalintas dominuojantis folikulas, turėjo 72 % donorių, tuo metu tik 33 % donorių turėjo ovuliacijos požymius karvių grupėje, kurioje folikulas nebuvo šalinamas.

### **1.9. Estrogenų ir progesterono naudojimas folikulų augimo bangos sinchronizacijai**

Bo su bendraautorais (1995) pranešė apie sėkmingai sukeltą naujos folikulų augimo bangos atsiradimą, panaudojant estradiolio (sintetinis estrogenas) ir progestino (sintetinis hormonas, identiškas natūraliam progesteronui) derinį.

Patobulintose superovuliacijos schemose JAV ir Kanadoje prieš superovuliaciją donorėms buvo skiriamas steroidinis hormonas estradiolis-17  $\beta$  ar vienas iš jo esterių (Lane et al., 2008), kurie slopina dominuojančio folikulo vystymąsi (Bo et al., 1993). Estradiolis yra labai efektyvus sinchronizuojant folikulų augimo bangos pasirodymą superovuliacijos metu, bet Europoje yra draudžiamas naudoti ūkinių gyvūnų gydymui (Butler et al., 2012; Manes et al., 2012; Mapletoft, Bo, 2013).

Naujos folikulų augimo bangos atsiradimo laikas po estradiolio ir progestino injekcijos nėra pastovus ir gali keistis, jei donorėms leidžiamos skirtingos estradiolio preparatų dozės (Colazo et al., 2005). Pasak Diskin ir kolegų (2002), gydymas estradioliu ir progestinu sukelia naujos folikulų augimo bangos atsiradimą 3–6 parą po šių preparatų injekcijos. Superovuliacijai sukelti dažniausiai naudojami 5 ar 2,5 mg estradiolis-17 $\beta$ , ar 2 mg estradiolio benzoatas, ir 100 arba 50 mg progestino injekcijos į raumenis (Bo et al., 2002, 2006; Mapletoft et al., 2002). Estradiolis derinyje su progestinu sukelia liuteolizę ir, mažindamas cirkuliuojančio FSH koncentraciją, stabdo antralinių folikulų vystymąsi. Kai estradiolis metabolizuojamas, išsiskiria FSH ir yra imituojama visavertė folikulinė lytinio ciklo fazė, atsirandanti vidutiniškai 4 parą po estradiolio ir progestino injekcijos (Bo et al., 1995; Garcia, Salaheddine, 2001). Estradiolio ir progestino derinio panaudojimas leidžia pradėti kiaušidžių stimuliaciją gonadotropiniais embrionų transplantacijos specialistams patogiu laiku, nepriklausomai nuo donorės lytinio ciklo stadijos (Nasser et al. 1993, Baracaldo et al., 2000) ir pagerina išplaunamų embrionų kokybę (Bo, Mapletoft, 2014).

### 1.10. Kiaušidžių stimuliacija gonadotropiniais ir jų deriniais

Kaip alternatyva JAV ir Kanadoje plačiai naudojamiems superovuliacijos protokolams, pagal kuriuos prieš kiaušidžių stimuliaciją estradioliu ir progestinu yra sinchronizuojama folikulų augimo banga, gali būti superovuliacijos protokoliai, kai kiaušidžių stimuliacija FSH pradedama po ovuliacijos, kylant pirmai folikulų augimo bangai (Armstrong, 1993; Nasser et al., 1993; Menchaca et al., 2002). Pagal tokius protokolus bet kurią lytinio ciklo parą (superovuliacijos protokolo 0 para) į raumenis yra leidžiamas  $\text{PGF}_{2\alpha}$ , o į makštį įvedamas progesterono implantas. Po 7 parų į raumenis suleistas GnRH sukelia persistuojančio folikulo ovuliaciją ir sinchronizuoja naujos folikulų augimo bangos kilimą. Kiaušidžių stimuliacija FSH pradedama po 36 val. nuo GnRH suleidimo (Carballo Guerrero et al., 2010) ir tęsiama pagal įprastinius 4 parų superovuliacijos protokolus, FSH leidžiant mažėjančiomis dozėmis. 12 paros ryte yra išimamas progesterono implantas ir į raumenis suleidžiamas  $\text{PGF}_{2\alpha}$ . Po 24 val. į raumenis papildomai suleidus GnRH, po 12 ir 24 val. donorės turi būti sėklinamos (Mapletoft, Bo, 2012). Nustatyta, kad pagal šią presinchronizacijos schemą po GnRH suleidimo pirmą kartą ovuliacija įvyksta daugiau nei 95 % donorių, o superovuliacijos atsakas, išplautų embrionų skaičius ir kokybė yra panašūs kaip ir atliekant presinchronizaciją estradioliu ir progestinu (Bo et al., 2010).

Pagal kitų mokslininkų aprašytus superovuliacijos protokolus buvo fiksuojama natūrali donorių ruja ir bandoma kiaušidžių stimuliaciją gonadotropiniais pradėti lytinio ciklo pradžioje, kylant pirmai folikulų augimo bangai po rujanės (Ginther et al., 1989; Nasser et al., 1993). Adams ir kolegų (1994) duomenimis, superovuliacijos efektyvumas nesiskyrė kiaušidžių stimuliaciją pradėjus pirmos ir antros folikulų augimo bangos kilimo metu. Tačiau norint užtikrinti išplaunamų embrionų kokybę būtina į makštį įvesti progesterono implantą, kad pirmos bangos folikulų ovocitai augtų ir bręstų progesterono fone (Nasser et al., 2011).

Sinchronizuojant folikulinės bangos atsiradimą su GnRH gaunami rezultatai yra kintantys. Tačiau buvo įrodyta, kad išankstinė presinchronizacija progestiniais pagerina kiaušidžių atsaką pradėjus stimuliaciją su GnRH pirmos folikulų augimo bangos pradžioje, o gaunami rezultatai buvo geresni nei naudojant estradiolio preparatus (Mapletoft, Bo, 2013).

Toliau tobulinant superovuliacijos protokolus buvo pradėta taikyti presinchronizacijos schemas, skatinančias mažų folikulų tolesnį vystymąsi. Per parą augančio folikulo skersmuo padidėja nuo 1 iki 2 mm, kuris

normalų išsivysčiusio folikulo dydį pasiekia per 2–3 paras. Nustatyta, kad mažiems folikulams reikalingas FSH, kuris skatintų tolesnį jų vystymąsi. Manoma, kad maži 1 mm skersmens folikulai yra jautrūs egzogeniniui FSH, jo veikiami folikulai pradeda visavertį vystymąsi iki visiško subrendimo (Adams et al., 2008). Buvo iškelta hipotezė, kad egzogeninis FSH gali priversti šiuos folikulus užaugti iki 3 ar 4 mm skersmens. Šio teiginio patvirtinimui buvo bandomi superovuliacijos protokolai, kurie įrodytų gaunamų embrionų skaičiaus padidėjimą naudojant įvairius gonadotropinų preparatus ir jų derinius (Bo et al., 2008). Vykdamas kiaušidžių stimuliaciją gonadotropiniais svarbu atsižvelgti į kiaušidžių folikulų augimo dinamiką ir folikulų augimo bangų kaitą, tikslų ovuliacijos ir stimuliuotų donorių sėklinimo laiko nustatymą, pasirinktą preparatų dozę ir jų leidimo dažnumą (Baruselli et al., 2011).

Egzogeninių gonadotropinų aplikacijos schemas turi imituoti natūralią FSH ir LH koncentracijos kaitą gyvulio organizme. Norint sinchronizuoti rūją ir numatyti sėklinimo laiką, kartu duodamas prostaglandinai arba jų analogai. Gonadotropinai pradedami naudoti 8–12 parą po nustatytos rūjos, prasidėjus antrai folikulinei bangai (Sato et al., 2005). Tolesni tyrimai parodė, kad presinchronizacijai panaudotas eCG gali padidinti granuliozinių ląstelių skaičiaus didėjimą (apskaičiuotas jų mitozinis indeksas), paskatinti preantralinių ir ankstyvųjų antralinių folikulų vystymąsi, jų augimą, sumažinti folikulų atreziją (Monniaux et al., 1984).

Atlikta daug tyrimų nustatant, koks ryšys yra tarp naudojamų gonadotropinų dozių ir superovuliacijos metu atsiradusių folikulų skaičiaus. Esant didesniai folikulų skaičiui yra gaunami geresni embrionų išeigos rezultatai. Tačiau tradiciniai superovuliacijos protokolai, susidedantys iš dviejų egzogeninių FSH injekcijų per parą, leidžiamų 4 paras iš eilės (Mapletoft, Bo, 2012), gali sukelti perdėtą įtampą donorėms, lemiančią sumažėjusį superovuliacijos atsaką (Stoebel, Moberg, 1982).

Ilgą laiką buvo vykdyta daug išsamių tyrimų nustatant, koks yra naudojamų egzogeninių gonadotropinų dozių poveikis superovuliacijos atsakui. Barati su kolegomis (2006) teigė, kad superovuliacijai sukelti naudota 250 mg Folltropin-V dozė buvo per didelė, nes perstimuliavo kiaušides ir embrionų plovimo metu kiaušidėse buvo nustatytas didelis skaičius neovuljavusių folikulų. Kanitz su kolegomis (2002) pranešė, kad didelės FSH dozės sutrikdo ovuliacijos procesus, todėl sumažina embrionų išeigą.

Barros su kolegomis (2008) atliko bandymą, kurio metu karvių kiaušidės buvo stimuliuotos su Folltropin-V daugiau kaip 3 paras, o dvi FSH injekcijos 4 parą buvo pakeistos dviem 200 eCG TV injekcijomis. Donorės kontrolinėje grupėje buvo stimuliuotos pagal tradicinį protokolą 8

injekcijomis po du kartus per parą mažėjančiomis FSH dozėmis. Nustatyta, kad stimuliacija su dviem eCG injekcijomis žymiai padidino bendrą išplautų ovocitų/embrionų kiekį ir transplantacijai tinkamų embrionų skaičių. Bo su bendraautorais (2008) paskelbė, kad išankstinė donorių kiaušidžių stimuliacija su 400 TV eCG doze 2 paras prieš pasirodant folikulinei bangai pagerino superovuliacijos atsaką. Buvo teigiama, kad eCG papildė folikulinę bangą naujais folikulais. Vėliau buvo tiriama ar folikulinė banga bus papildyta naujais folikulais, pailginus superovuliacijos protokolą nuo tradicinių 4 parų iki 7 parų (Garcia Guerra et al., 2012).

Pastebėta, kad prailgintas superovuliacijos protokolą, nepadidinus bendro FSH kiekio, padidino ovuliuojančių folikulų kiekį ir ovuliacijų skaičių, taip pat buvo pastebimas padidėjęs vidutinis išplautų ovocitų/embrionų, apvaisintų kiaušinėlių ir transplantacijai tinkamų embrionų skaičius. Taigi prailgintas superovuliacijos protokolą gali būti efektyvi priemonė papildant folikulinę bangą mažais folikulais, kuriems papildomas laikas leidžia užaugti ir pasiekti ovuliacinį dydį. Šie rezultatai parodo, kad tradiciniai 4 parų kiaušidžių stimuliacijos protokolai galbūt yra per trumpi daliai folikulų, nespėjančių kartu su kitais tos pačios bangos folikulais užaugti iki reikiamo dydžio ir ovuliuoti, todėl gali būti gaunama mažesnė embrionų išeiga (Mapletoft, Bo, 2013).

Daugiau kaip prieš 20 metų buvo pranešta, kad viena poodinė FSH injekcija aukštos kūno masės indeksu mėsinėms karvėms pagerino superovuliacijos atsaką, lyginant su tradiciniu superovuliacijos protokolu, kai kiaušidžių stimuliacija vykdoma du kartus per parą 4 paras iš eilės (Bo et al., 1994). Atliekant tyrimus su holšteinų veislės karvėmis FSH injekcija buvo padalinta į dvi dalis: 75 % bendros FSH dozės į paodį buvo suleista pirmą stimuliacijos parą, likę 25 % – 48 val. vėliau (Lovie et al., 1994). Bandymo metu nustatyta, kad superovuliacijos atsakas buvo blogesnis, nei naudojant tradicinį protokolą, kai 4–5 paras iš eilės ryte ir vakare leidžiamas FSH (Mapletoft, Bo, 2013).

Tobulinant šį metodą buvo pasiūlyta sujungti kiaušidžių stimuliacijos hipofizės ekstraktą su medžiagomis, kurios priverčia išskirti hormoną lėtai, keletą parų. Tokios medžiagos gali būti polimerai, kurie yra skaidomi mikroorganizmų, bet nesukelia reakcijų audiniuose (Sutherland, 1991).

2011 metais buvo užbaigti tyrimai, kuriuose FSH buvo atskiestas 2 % hialurono rūgšties tirpalu ir paruoštas naudoti kaip viena injekcija į raumenis. Buvo gautas panašus skaičius ovocitų ir embrionų kaip ir tradiciniame FSH protokole (Tribulo et al., 2011). Tačiau 2 % hialurono tirpalas buvo klampus ir sunkiai sumaišomas su FSH, ypač lauko sąlygomis. Buvo bandoma jį daugiau atskiesti, bet pagreitėjus rezorbcijai nuspręsta FSH dozę padalinti į dvi injekcijas (Tribulo et al., 2012). Mažesnės

koncentracijos 0,5 % hialurono tirpalas buvo lengvai maišomas su FSH net lauko sąlygomis. Hialurono tirpalo naudojimas parodė, kad galima sukelti nuoseklų superovuliacijos atsaką mėsiniams galvijams po dviejų injekcijų, gaunant didesnę transplantacijai tinkamų embrionų skaičių (Mapletoft, Bo, 2013).

Superovuliacijai sukelti neseniai pradėti naudoti GnRH ir progestinų deriniai, norint imituoti geltonojo kūno funkciją bet kuriuo lytinio ciklo metu (Bo et al., 2008; Carballo Guerrero et al., 2009). Misra ir kiti mokslininkai (1994) pranešė, kad kiaušidžių stimuliacijai naudojant tik gonadotropinus (3000 TV) nustatyta mažiau ovuliacijų (3,76/karvei), lyginant su rezultatais, gautais papildomai naudojant progestinus (4,5/karvei) ar intravagininį implantą CIDR (7,5/karvei).

Son su kolegomis (2007) pranešė, kad bet kurioje lytinio ciklo stadijoje pradėjus kiaušidžių stimuliaciją GnRH ir CIDR deriniu ir prieš donorės sėklinimą panaudojus LH, galima efektyviai dirbtinai sukelti liuteininės fazės kontrolę, folikulų vystymąsi ir ovuliacijos sinchronizaciją.

### **1.11. Stimuliacija rekombinantiniu galvijų somatotropinu**

Rekombinantinio galvijų somatotropino (bST) naudojimas kiaušidžių stimuliacijai yra dar viena mokslinių tyrimų kryptis, tobulinant superovuliacijos protokolus. Galvijų somatotropinas gali paskatinti sintezę panašaus į insuliną augimo hormono (IGF-I) daugelyje audinių, įskaitant ir kiaušides. IGF-I vaidina svarbų vaidmenį žinduolių reprodukcijoje (Kadokia et al., 2001). Atliekami tyrimai įrodė IGF-I svarbą superovuliacijos rezultatams (Herrler et al., 1994; O'Callaghan et al., 2000; Cushman et al., 2001; Velazquez et al., 2005). Įrodyta, kad IGF-I per folikulų skysčių pokyčius įtakoja didesnę *in vivo* būdu gautų gyvybingų embrionų kiekį (Cushman et al., 2001).

Spicer ir Geisert (1992) nurodė, kad IGF-I koncentracija mažuose folikuluose yra žemesnė nei vidutiniuose ar dideliuose. Katz su kolegomis (1993) pranešė apie intraovarinės sistemos IGF-I buvimą su receptoriais ir privalomaisiais baltymais. Manant, kad bST gali suaktyvinti IGF-I sintezę, skatinančią granuliozinių ląstelių vystymąsi, buvo tikimasi, kad bST gali daryti įtaką ovocitų kokybei ir superovuliacijos atsakui. Kai kurie tyrimai parodė intensyvesnį abiejų kiaušidžių atsaką į stimuliaciją ir padidėjusią embrionų išeigą kiaušidžių stimuliacijai naudojant schemas su bST (Herrler et al., 1994), tačiau ne visi tyrimai buvo teigiami (Gray et al., 1993). Naudojant bST superovuliacijos metu gali būti paveikiama embrionų

kokybė per ovocitų pakitimus folikulų vystymosi metu (Sirard et al., 2006) arba tiesiogiai vystantis embrionui, kai jis yra kiaušintakyje ar gimdoje (Barnes, 2000; Greve, Callesen, 2001; Killian, 2004).

Europos Sąjungoje ir daugelyje kitų šalių bST naudojimas yra draudžiamas, todėl embrionų transplantacijos specialistai ir mokslininkai, atsižvelgdami į bST veikimo principą gerinant embrionų išėgą, ieško alternatyvių būdų įtakoti ovocitų kokybę folikulų vystymosi metu, siekiant padidinti transplantacijai tinkamų embrionų kiekį.

### **1.12. Fizioterapija lazerio šviesa**

Pastaraisiais metais vis plačiau kalbama apie lazerio šviesos terapiją, kaip perspektyvų metodą gydant artimo spektro ŽILŠ spinduliais. Tai nauja ir unikali priemonė, galinti pakeisti medikamentinį gydymą. Nustatyta, kad ŽILŠ stimuliacija teigiamai veikia reprodukcinę funkciją.

Gydymas lazeriu grindžiamas skirtingo intensyvumo šviesos sąveika su bioobjektais, panaudojant dviejų tipų lazerius: aukšto ir žemo intensyvumo (Calin, Coman, 2011). Lazerio generuojama energija įsiskverbia į audinį skirtingu gyliu, priklausomai nuo bangos ilgio. Daugelyje bandymų su gyvūnais naudojami ultravioletiniai lazeriai, mažiau tyrimų atliekama su infraraudonaisiais. Žalieji (400–500 nm) ir mėlynieji (500–550 nm) lazeriai šiuo metu dar tobulinami, jų naudojimas klinikinėje praktikoje labai ribotas. Raudonosios (600–700 nm) šviesos bangos ilgio lazeriai naudojami daugiausiai, 2–3 mm įsiskverbęs į audinį jų intensyvumas sumažėja perpus, todėl raudonieji spinduliai naudojami paviršinių audinių, dermatologinių ligų gydymui. Infraraudonųjų (700–950 nm) lazerių intensyvumas sumažėja perpus įsiskverbęs į audinį 2–3 cm. Šie lazeriai naudojami giliai esančių struktūrų (sąnarių, raumenų, sausgyslių patologijoms gydyti, skausmui mažinti, hematų rezorbcijai ir stimuliuoti žaizdų regeneraciją) terapijoje (Chung et al., 2012).

Pirmieji lazeriai medicinoje pradėti taikyti 1961 metais oftalmologijoje ir dermatologijoje (Geiges, 2011), 1965 metais sėkmingai atlikta pirmoji operacija naudojant argono lazerio spinduliuotę, pritvirtinant tinklainę prie akies dugno. 1962 metais Goldman pirmą kartą lazerį panaudojo dermatologijoje, veikiant odos pigmentines dėmes ir plaukų folikulus (Goldman et al., 1963). Chirurgijoje 1972 metais pirmą kartą panaudotas anglies dvideginio lazeris. 1983 metais atliktas CO<sub>2</sub> lazerio šviesos perdavimas skaidulomis laringologijoje ir endoskopijoje (Goldman, 1983). Lazeriai taip pat naudojami ir veterinarijoje gydant karvių, kiaulių, ožkų ir

kitų patelių mastitus, uždegiminius procesus, paviršutines žaizdas (įpjovas, įbrėžimus), negyjančias opas, granulomas, fistules, siekiant pagreitinti kaulų lūžių gijimą (Nores et al., 2001; Simunovic et al., 2000). Pirmasis lazeris, kurį buvo galima panaudoti praktikoje, buvo pagamintas 1967 metais (Mester et al., 1969). Pirmieji tyrimai buvo atlikti su pelėmis, norint nustatyti kokį poveikį lazerinė radiacija turi gyvam organizmui (Mester et al., 1968). Atlikus daugiau bandymų su laboratoriniais gyvūnais nustatyta, kad žemo intensyvumo lazerio spinduliai ardo ir įvairias patogeninių mikroorganizmų kultūras, tokias kaip *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, skatina kraujagyslių atsistatymą (Bayat et al., 2006).

Gyvulininkystėje pirmasis lazeris buvo panaudotas šunims (Jako, 1972) ir arkliams (Tate et al., 1986) atliekant gerklų chirurgiją. Po keleto metų lazeris plačiai buvo pradėtas naudoti smulkių gyvūnų klinikinėje praktikoje gydant gerklų (Jacobs, Rosen, 2000; Panjehpour et al., 2002), burnos (McCaw et al., 2000), prostatos (His et al., 2001; Lucroy et al., 2003; L'Eplattenier et al., 2008; Jankun et al., 2004), odos vėžį (Buchholz et al., 2007; Stell et al., 2001; Tanabe et al., 2004) ir smegenų auglius šunims (Lucroy et al., 2000; Schmidt et al., 1999). Fototerapinės procedūros plačiai pradėtos naudoti arkliams gydant artritus, tendovaginitus, artrozes ar sportinių žirgų žaizdas po traumų (Ghamsari et al., 1997). Ūkinės paskirties gyvūnams lazeriai naudojami dermatologinėms ir dantenų ligoms gydyti (Ogata, 1990), smulkiems gyvūnams – ūminio išorinės ausies uždegimo, bursito ir tendinito gydymui (Watanabe, 1996).

Pastebėta, kad gyvūnų audiniai gali praleisti tam tikro ilgio šviesos bangas. Šviesos absorbcija ir skverbimasis priklauso nuo audinio cheminės sudėties. Pagrindinis skirtumas tarp lazerio spinduliuotės ir paprastos šviesos yra tas, kad lazerio spinduliuotė yra koherentinė, t. y. jos skėstis nėra didelė ir šviesa sklinda siauru spinduliu, todėl yra sufokusuojama lengviau. Lazerių spinduliuojama šviesa yra vienspalvė, o lazerio spinduliuotė gali būti labai galinga.

Lazerio spinduliai veikia ląstelių metabolizmą, skatina regeneraciją (Huang et al., 2009). Sustiprėja azoto oksidų, histamino, serotoninino, prostaglandinų sintezė, išsiplečia kraujagyslės. Dėl lazerio poveikio padidėja leukocitų aktyvumas, skatinama vaskuliarizacija, sureguliuojama vietinė temperatūra, mažėja uždegimo simptomai (Bayat et al., 2006). Lazerio spindulių veikimas siejamas su pokyčiais ląstelėje (Gao et al., 2006). ŽILŠ terapijai panaudojama adenozintrifosfato (ATP) formos šviesos energija, siekiant sukelti biologinį atsaką veikiamam kūnui. Padidėjusi ląstelės energija ir pakitusi ląstelės membranos sienelė sumažina jaučiamą skausmą, žaizdos gijimą, veikiami spindulių raumenys atsipalaiduoja, vyksta imuninės sistemos moduliacija ir nervų regeneracija.

Lazerinė fototerapija yra pagrįsta lazerine radiacine citochromų ir porfirinų absorbcija mitochondrijose ir ląstelių membranose. Laisvasis deguonis yra laisvųjų radikalų pagrindas ir viena aktyviausių formų metabolinėse reakcijose. Dėl laisvojo deguonies gamybos susidarę protoniniai gradientai praeina mitochondrijų bei ląstelių membranas, keisdami jų pralaidumą skirtingiems jonams. Visa tai sąlygoja ląstelių medžiagų apykaitos pokyčius ląsteliniame ir neląsteliniame lygmenyje ir leidžia pritaikyti lazerinę fototerapiją gydymo tikslams (Calin, Coman, 2011).

ŽILŠ stimuliacijos taikymas teigiamai veikia reprodukcinę funkciją. Pirmą kartą reprodukcijoje anglies dvideginio lazeris buvo panaudotas 1983 metais karvėms gydant endometriumo cistas (Fayez et al., 1983). 1993 metais Blikslager su kolegomis (1993) pranešė, kad helio-neono (He-Ne) lazeris endometriumo cistas veikia geriau nei anglies dvideginio lazeriai, kadangi jis pagerina audinio vaskuliarizaciją (Blikslager et al., 1993). Pastaraisiais metais ieškant naujų, efektyvesnių ir ekologiškų gydymo metodų karvių reprodukcijoje, vis plačiau kalbama apie šviesos terapiją. Ginekologinėje praktikoje ŽILŠ stimuliacija buvo pradėta taikyti kaip pagalbinė priemonė gydant karvių pūlingąją mastitą (Aleksenko et al., 1987). Nustatyta, kad lazerio spinduliai stabilizuoja ląstelės membraną, suaktyvina ATP sintezę (Karu et al., 2005). 2013 metais buvo vertinamas lazerio poveikis melžiamų karvių sveikatai, lazeris buvo naudojamas kaip profilaktikos ir gydymo priemonė karvių endometritui (Žilaitis ir kt., 2013).

Lazerių spindulių poveikis sukelia pokyčius ląstelėse. Priklausomai nuo gyvulio rūšies ir spindulių intensyvumo, lazerio spinduliai gali stabilizuoti ląstelės membraną, suaktyvinti adenozintrifosfato sintezę (Shu et al., 2002). Fotomoduliaciniu poveikiu pasižymintios šviesos bangos, taikomos gyvūnų lytinių ląstelių (spermatozoidų ir ovocitų) funkcijų suaktyvinimui, apvaisinimui, embrionų produkcijoje (Abdel-Salam, Harith, 2015).

### **1.13. Lazerio šviesos poveikis ovocitų vystymuisi**

Soares su kolegomis (2014) panaudojo He-Ne lazerį (632 nm), ovocitų stimuliacijai. Buvo nustatyta, kad lazerio spinduliai moduliuoja ir keičia procesus granuliozinėse ląstelėse, reguliuojančiose ovocituose vykstančias reakcijas. Moreno Millan ir Ocana-Quero (2009) panaudojo žemo intensyvumo He-Ne lazerį nesubrendusių ovocitų stimuliacijai ir įrodė, kad veikiant  $0,40 \text{ J/cm}^2$  ir  $2,00 \text{ J/cm}^2$  dozėmis, lazerio spinduliai neigiamai paveikė ovocitų brendimo procesą, sukeldami branduolio sunykimą.

Tyrimai rodo, kad sąveika tarp lazerio spinduliuotės ir ląstelių vyksta dėl fotonų absorbcijos fotoreceptoriuose, todėl yra sukeltos cheminės reakcijos, tokios kaip gliukolizė ir oksidacinis fosforilinimas. Kaip vienas iš galimų fotoreceptorių, galinčių sąveikauti su lazerio šviesa, yra citochromoksidazė C. Šios sąveikos metu mitochondrijų vidinės membranos didina ATP sintezę. Šie procesai pagreitina ribonukleino rūgšties (RNR) transkripciją ir deoksiribonukleorūgšties (DNR) replikaciją. Lazerio šviesa pagreitina mitozę ir paveikia skirtingus medžiagų apykaitos procesus, kurie vyksta mitochondrijų membranoje. Tuo pačiu metu He-Ne lazerinė radiacija 2, 4, 8, ir 16 J/cm<sup>2</sup> dozėmis buvo naudojama akrosominei reakcijai paskatinti, stimuliacijos efektas buvo aukštesnis negu veikiant cheminėmis kapitacijos medžiagomis – heparinu, kalciu, kofeinu (Moreno Millan, Ocana-Quero, 2009). Ovocitai brendimo metu kenčia nuo gausios transformacijos, kad pasiruoštų apvaisinimui ir embriono išsivystymui (Fujiwara et al., 1991). Efektyvesnis ŽILŠ stimuliacijos poveikis ovocitams yra sukeltas naudojant mažesnes dozes ir per trumpesnę laiką nei juos veikiant He-Ne lazeriu (Abdel-Salam, Harith, 2015). Ocana-Quero su kolegomis (1997) aprašė He-Ne lazerio degeneracinį poveikį galvijų ovocitams. Stimuliuojant aukšto intensyvumo lazeriu pelių ovocitus pastebėta neigiama spinduliuotės įtaka DNR. Veikiant DNR 266 nm spinduliais, lazeris nepadarė neigiamo poveikio genetinėms struktūroms (Ebner et al., 2005).

Daugumos žinduolių ovocitas Grafo folikule yra apsuptas glaudžiai išsidėsčiusių kamuolinių ląstelių sluoksniu, suformuojančiu kamuolinių ląstelių ir ovocito kompleksą (COCs), kuris yra svarbus ovuliacijos procese, ovocito brendimo, apvaisinimo ir embriono išsivystymo laikotarpiu (Yokoo, Sato, 2004). 2014 metais buvo atliktas tyrimas norint nustatyti kaip *in vitro* sąlygomis lazerio stimuliacija veikia COCs. Šis kompleksas buvo veikiamas 633 nm šviesos bangos ilgiu ir 1 J/cm<sup>2</sup> doze. COCs pokyčiai vertinti po 30 minučių, 8, 16, ir 24 valandų. Įvertinus lazerio poveikį mitochondrijoms, ovocito mitozinėms reakcijoms (branduolyje), polimerazės grandininėms reakcijoms ir signalų perdavimams ląstelėse nustatyta, kad stimuliacija lazeriu turėjo teigiamos įtakos granuliozinių ląstelių ir medžiagų apykaitos pokyčiams, buvo efektyvi moduluojant granuliozinių ląstelių ir ovocitų metabolizmą (Soares et al., 2014).

Moksliniais tyrimais įrodyta, kad dėl spinduliuotės poveikio sumažėja triušių (Regaud, Lacassagne, 1913), žiurkių (Ingram, 1958) ir pelių (Peters, Levy, 1964) vadų skaičius bei vados dydis. Šis sumažėjimas yra siejamas su ovocitų skaičiaus pokyčiais. Tyrimų metu didelis dėmesys buvo skirtas folikulų pakitimams stimuliacijos metu, tačiau nebuvo nustatytas neigiamas

poveikis dideliems antraliniams folikulams stimuliacijos metu (Driancourt et al., 1982).

Lazerio šviesa veikia ovocitus ir granuliozines ląsteles jų brendimo metu, pirmąsias valandas po stimuliacijos padidėja mitochondrijose ATP sintezė, ji paveikia ovocito citoplazmos komunikaciją su jungtimis. ATP skatina PKA (proteino fosfatazės), MAPK (kainazės) ir MPF (brendimą skatinančio faktoriaus) sintezę. Padidėjęs MPF kiekis blokuoja ovocito vystymąsi profazės stadijoje. Sukeliama granuliozinių ląstelių proliferacija, pakinta atsakas į hormonus (LH ir FSH) bei augimo faktorius. ATP ir PKA kiekis sumažėja, dėl to suaktyvėja MAPK ir MPF, blokuojamos germinatyvinės pūslelės, sukelia mejozės progresija. Paskutinėmis stimuliacijos valandomis lazerio šviesos spinduliai vėl padidina ATP ir PKA sintezę dėl mitochondrijų membranos potencialo pokyčių, šių reakcijų metu subrendusi kiaušialąstė lengviau išeina iš folikulo. Granuliozinės ląstelės yra atsakingos už genų replikaciją ir estrogenų sintezę (Soares et al., 2014). Šių reakcijų metu vyksta greitesnis kiaušinėlio brendimas, jų yra subrandinama daugiau, veikiant žemo intensyvumo lazeriu nustatomas didesnis procentas visavertiškai subrendusių ovocitų su nepažeistais branduoliais, kiaušintakyje jie subręsta greičiau ir apvaisina.

#### **1.14. Lazerio šviesos poveikis spermatozoidų judrumui ir apvaisinimo galiai**

1980 metais žalieji (532 nm) lazeriai buvo pradėti naudoti įvairių veislių galvijų spermatozoidų kriokonservacijos procese kaip priemonė, padedanti jiems greičiau atsinaujinti ir subręsti (Abdel-Salam et al., 2011). Kai kurie galvijų spermatozoidų biocheminių ir medžiagų apykaitos savybių teigiami pokyčiai buvo susieti su ŽILŠ stimuliacijos nauda (Dreyer et al., 2014). Veikiant galvijų spermatozoidus žemo intensyvumo He-Ne lazeriu (633 nm), buvo nustatytas spermatozoidų kiekio ir judrumo padidėjimas (Corral-Baques et al., 2009). Lazerio stimuliacija padidina ATP gamybą mitochondrijose, todėl dėl jo poveikio ląstelėje padidėja energijos kiekis. Kadangi spermatozoidų judrumas ir ovocitų brendimas priklauso nuo ląstelėje esančios energijos, dėl lazerio poveikio padidėjęs energijos kiekis yra labai svarbus šiuose procesuose (Abdel-Salam, Harith, 2015).

Biocheminė ir topologinė spermatozoidų analizė veikiant ŽILŠ parodė spermatozoidų medžiagų apykaitos pakitimus. Atlikus daugiau tyrimų buvo nustatyta optimali dozė, didinanti apvaisinimo galią (Dreyer et al., 2011). Wenbin su kolegomis (1996) įrodė, kad veikiant spermą lazeriu padidėja

fruktozės fermentacija, suintensyvėja ląstelių kvėpavimo procesai, intensyviau pernešami elektronai, padidėja fosforo sunaudojimas ir kalcio absorbcija, visi šie procesai pailgina spermatozoidų gyvybingumą. Zan-Bar su kolegomis (2005) patvirtino, kad lazerio skleidžiamos šviesos spinduliai tarpininkauja per reaktyviąją deguonies rūšį (ROS). Didelis kiekis šio deguonies gali sukelti ląstelių nekrozę (ATP išsekimą ir lipidų peroksidaciją), esant nedideliame kiekiui, šis deguonis vaidina pagrindinį vaidmenį daugelio ląstelių procesų aktyvacijoje, naujų baltymų, laisvojo azoto oksido (NO) sintezės, superoksido dismutazės, citokinų sintezėje (Zan-Bar et al., 2005). Nustatyta, kad lazerio spinduliai skatina susidaryti NO, kuris gali būti atsakingas už kraujagyslių lygiųjų raumenų atsipalaidavimą ir kvėpavimo grandinės aktyvaciją mitochondrijose, NO sukelia spermos hiperkapitaciją ir akrosominę reakciją (Martinez-Pastor et al., 2009).

Nustatyta, kad šunų spermą pastimuliavus ŽILŠ 655 nm šviesos bangos ilgiu 4,6 ir 10 J/cm<sup>2</sup> dozėmis, praėjus 45 minutėms po procedūros, spermatozoidai buvo išlaikę savo pirminį aktyvumą (Corral-Baques et al., 2005). Stimuliacija ŽILŠ turėjo teigiamos įtakos spermatozoidų kiekiui, greičiui, judrumui, jų linijiniam koeficientui bei gebėjimui apvaisinti, ŽILŠ stimuliuotoje spermoje kalcio jonų kiekis nebuvo padidėjęs, tačiau buvo blokuojami kalcio kanalai (Corral-Baques et al., 2009). Yazdi su kolegomis (2010) pranešė apie 830 nm lazerio spinduliuotės poveikį žmogaus spermos judrumui. Reikšmingas spermatozoidų judrumo padidėjimas nustatytas po ŽILŠ stimuliacijos 4,00 ir 6,00 J/cm<sup>2</sup> dozėmis, veikiant 60 ir 45 minutes.

Nustatyta, kad po spermatozoidų stimuliacijos pasikeičia ryšys tarp protaminų ir DNR, tai turi įtakos spermos kokybei (Tuncer et al., 2010) ir embrionų vystymuisi (Watson, 1995). Pastebimas ir metilo grupių kiekio sumažėjimas, kas yra labai svarbu embriono ląstelių genomo aktyvacijoje (Potok et al., 2013).

Tyrimais įrodyta, kad stimuliacijos poveikis priklauso nuo lazerio bangos ilgio ir gyvūno rūšies. Nustatyta, kad kalakutų spermatozoidų ilgaamžiškumas padidėja veikiant juos 3,96 J/cm<sup>2</sup> doze (Iaffaldano et al., 2005), galvijų spermatozoidus veikiant 16 J/cm<sup>2</sup> spindulių doze, buvo sukeltas jų mirtingumas (Ocana-Quero et al., 1997). Žuvies spermatozoidus paveikus raudonosios (600–700 nm) ir baltosios (400–800 nm) šviesos bangos ilgio lazeriu nustatytas padidėjęs judrumas bei apvaisinimo galia, o avino spermatozoidų padidėjęs judrumas bei apvaisinimo galia pasireiškia paveikus tik raudonosios šviesos lazeriu. Tačiau stimuliacija su infraraudonaisiais (700–950 nm) lazeriais sukelia judrumo bei vaisingumo sumažėjimą abiem gyvūnų rūšims (Zan-Bar et al., 2005). Atliktų tyrimų metu gauti rezultatai įrodė, kad spermatozoidų stimuliavimas su skirtingo

intensyvumo lazeriais turėjo skirtingą poveikį spermos parametrams, apimdamas judrumą, greitį, gyvybingumą, taip pat parodė fizinius parametrų pokyčius, morfologinį, judėjimo ir organelių pakitimus (Silva, Gadella, 2006).

### 1.15. Literatūros apžvalgos apibendrinimas

Apibendrinant literatūros duomenis galima teigti, kad embrionų transplantacija yra pažangus, praktikoje pasiteisinęs metodas, kuris pagreitino produktyvių galvijų veisimą. Pagal Gordon (2004), embrionų transplantacijos metodo efektyvumas yra vertinamas pagal du kriterijus: superovuliacijos efektyvumą ir recipienčių veršingumo indeksą. Vienas iš pagrindinių veiksnių, stabdančių embrionų transplantacijos metodo dar platesnį naudojimą veislininkystės programose, yra sunkiai prognozuojamas superovuliacijos atsakas (Mapletoft, Bo, 2012). Pastaruoju metu mokslininkai, bandydami spręsti šią problemą, ieško naujų, efektyvesnių ir natūralių terapijos ar stimuliacijos priemonių, pagerinančių embrionų išėigą ir kokybę.

Pasaulyje siūloma keletas superovuliacijos optimizavimo būdų:

- tinkamas donorių parinkimas. Embrionų transplantacijai siūloma atsirinkti donores, kurių kiaušidėse prieš superovuliaciją nustatomas didelis skaičius mažesnių kaip 10 mm dydžio folikulų. Pagal Hasler (2014), svarbiausi veiksniai superovuliacijos rezultatams yra donorių veislė, amžius, reprodukcinė būklė ir reprodukcijos istorija, superovuliacijos protokolo veiksmingumas, klimatas, šėrimas bei spermos kokybė ir sėklinimo laikas;
- superovuliacijos protokolų tobulinimas. Dauguma šių dienų mokslininkų, siekiančių pagerinti superovuliacijos efektyvumą, kuria superovuliacijos protokolus, norėdami sinchronizuoti kiaušidžių stimuliacijos pradžią ir folikulų augimo bangos kilimą;
- stimuliacija bST. Naudojant bST superovuliacijos metu gali būti paveikiama embrionų kokybė per ovocitų pakitimus folikulų vystymosi metu arba tiesiogiai vystantis embrionui, kai jis yra kiaušintakyje ar gimdoje (Killian, 2004; Sirard et al., 2006);
- ŽILŠ terapija. Soares su kolegomis (2014) nustatė, kad lazerio spinduliai pagerina ovocitų kokybę folikulų vystymosi metu, padidindami transplantacijai tinkamų embrionų kiekį. 1980 metais buvo pradėti tyrimai siekiant nustatyti, kokį poveikį lazerio spinduliai turi spermatozoidams. Atliktų tyrimų metu gauti rezultatai įrodė, kad spermatozoidų stimuliavimas lazeriais įtakoja spermos parametrus, apimdamas judrumą, greitį,

gyvybingumą, taip pat parodė fizinius parametrų pokyčius, morfologinį, judėjimo ir organelių pakitimus (Silva, Gadella, 2006).

Taikant šiuos metodus sumažėja superovuliacijos atsako nenumatytumas, pagerėja ovocitų kokybė bei gaunama didesnė transplantacijai tinkamų embrionų išeiga.

## 2. DARBO METODIKA

### 2.1. Tyrimų etapai, laikas, objektas, eksperimentų vykdymo schema

Mokslinis tiriamasis darbas vykdytas 2008–2015 metais Lietuvos sveikatos mokslų universiteto Veterinarijos akademijoje, Anatomijos ir fiziologijos katedroje ir Neužkrečiamų ligų katedros Gyvulių reprodukcijos laboratorijoje. Darbas buvo vykdomas dviem etapais, atlikti 2 eksperimentai.

**Pirmame tyrimų etape** 2008–2012 metais vykdytas pirmasis eksperimentas, tiriant ŽILŠ stimuliacijos poveikį *in vivo* karvių reprodukcijos rodikliams. Eksperimentas vykdytas žemės ūkio bendrovėje, laikančioje 700 pieninių karvių. Buvo tiriamos 4–8 metų, 2–6 laktacijos Lietuvos, Danijos ir Vokietijos juodmargės karvės ( $n=270$ ), kurių vidutinis produktyvumas per praeitą laktaciją buvo 6850 kg. Karvės buvo laikomos besaičio, šalto laikymo karvidėse, be pakratų, guoliavietės išklotos guminiiais kilimėliais, mėšlas ir srutos surenkamos į kanalus, įrengtus po grotuotomis grindimis, girdoma – iš automatinių girdyklų. Karvių mityba buvo pastovi, nekito ištikus metus, šeriama buvo pašaro mišiniu, adekvačiu šeriamų karvių fiziologinei būklei. Paros davinys: kukurūzų silosas – 20 kg, šienainis – 19 kg, miežių šiaudai – 0,5 kg, melasa – 0,5 kg ir kombinuotas pašaras – 5,92 kg, kurio sudėtis: cukrinių runkelių griežiniai – 16,89 %, sojų rupiniai (49 % baltymingumas) – 16,89 %, kvietrugiai – 42,23 %, rapsų išspaudos – 16,89 %, Bergophor CaProVit H mineral – 3,38 %, pašarinis kalkakmenis – 0,84 %, druska (NaCl) – 0,51 %, monokalcio fosfatas – 1,01 %, soda – 1,35 %.

Eksperimento metu palyginus stimuliuotų ŽILŠ ir kontrolinių karvių grupių reprodukcijos rodiklius nustatytas teigiamas ŽILŠ stimuliacijos poveikis pieninių karvių reprodukcinei funkcijai, todėl stimuliacijos ŽILŠ poveikio tyrimai buvo tęsiami ir kitame etape.

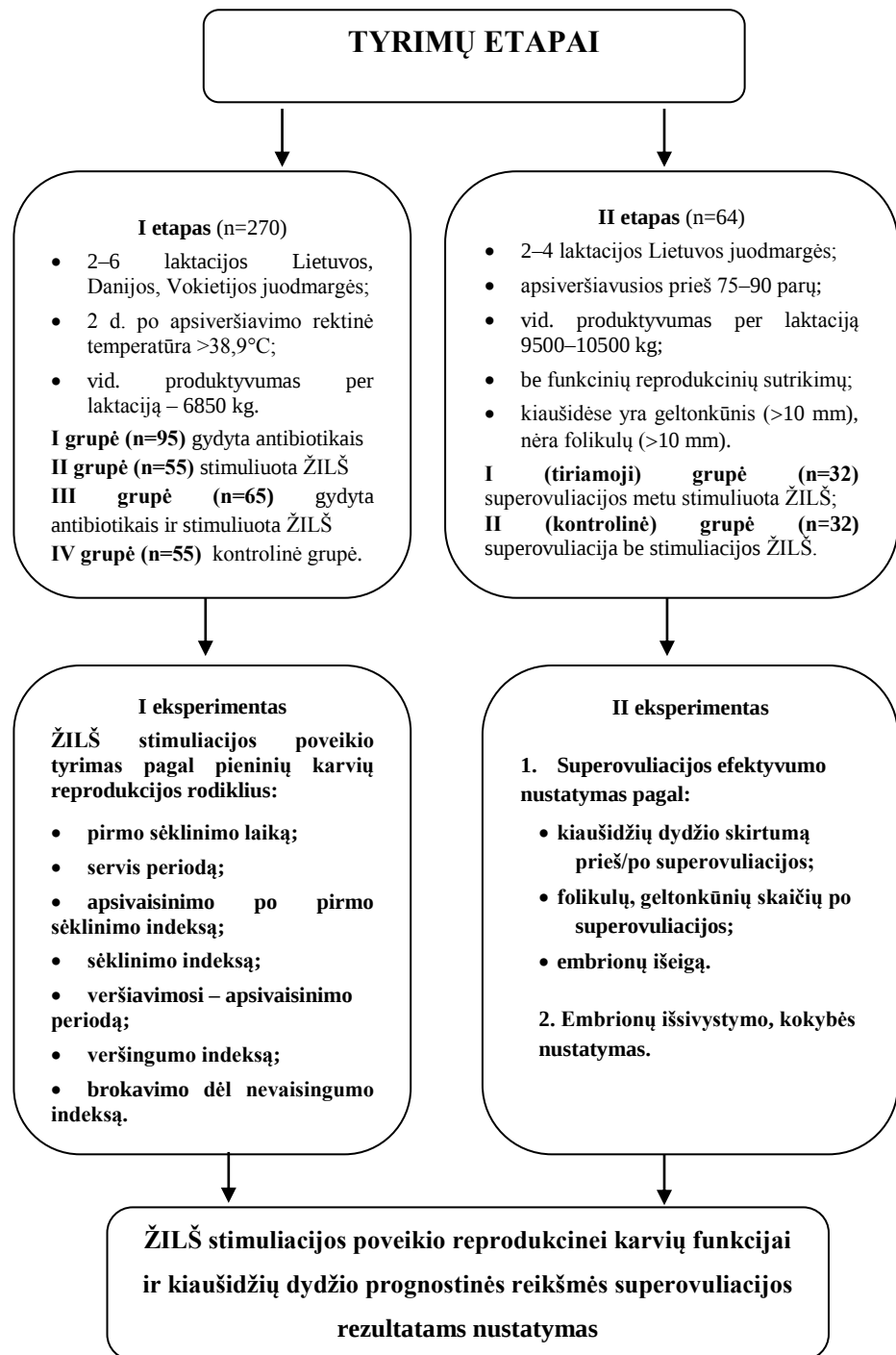
**Antrame tyrimų etape** 2013–2015 metais superovuliacijos efektyvumo ir embrionų kokybės tyrimai vykdyti veislinėje 400 Lietuvos juodmargių karvių pieninėje bandoje. Eksperimento metu tirtos 4–6 metų, 2–4 laktacijos kliniškai sveikos Lietuvos juodmargės karvės ( $n=64$ ), apsiveršiusios prieš 75–90 parų, kurių vidutinis produktyvumas per praeitą laktaciją buvo 9500–10 500 kg. Tiriamosios karvės buvo laikomos besaičio, šalto laikymo karvidėje, ant gilaus kraiko, girdoma – iš automatinių girdyklų. Karvių mityba buvo pastovi, nekito ištikus metus, šeriama buvo pašaro mišiniu,

adekvačiu šeriamų karvių fiziologinei būklei. Paros davinys: kukurūzų silosas – 24 kg, šienainis – 11 kg, miežių šiaudai – 0,8 kg, melasa – 0,5 kg ir kombinuotas pašaras – 8,74 kg, kurio sudėtis: cukrinių runkelių griežiniai – 20,59 %, sojų rupiniai (49 % baltymingumas) – 17,16 %, kvietrugiai – 34,32 %, rapsų išspaudos – 22,88 %, Bergophor CaProVit H mineral – 2,29 %, pašarinis kalkakmenis – 0,8 %, druska (NaCl) – 0,34 %, monokalcio fosfatas – 0,69 %, soda – 0,93 %.

Eksperimento metu nustatytos sąsajos tarp kiaušidžių dydžio, jų padėties kūno pusės atžvilgiu prieš superovuliacijos pradžią ir superovuliacijos rezultatų bei įvertintas stimuliacijos ŽILŠ poveikis superovuliacijos efektyvumui, embrionų kokybei ir jų išeigai.

Eksperimentai buvo atlikti laikantis gyvūnų gerovės reikalavimų bei vadovaujantis Lietuvos Respublikos veterinarijos įstatymu 2011 m. liepos 1 d. (Nr. XI-1189, 2010-11-30, Žin., 2010, Nr. 148-7563), Lietuvos Respublikos gyvūnų gerovės ir apsaugos įstatymu 2012 m. spalio 3 d. Nr. XI-2271 (Žin., 1997, Nr. 108-2728; 2000, Nr. 61-1808; 2001, Nr. 99-3521; 2003, Nr. 74-3418; 2004, Nr. 25-753) ir Mokslo ir mokymo tikslais naudojamų gyvūnų laikymo, priežiūros ir naudojimo reikalavimais, patvirtintais Valstybinės maisto ir veterinarijos tarnybos direktoriaus 2012 m. spalio 31 d. įsakymu Nr. B1-866 (Žin. 2012, Nr. 130-6595).

Pirmo ir antro tyrimų etapų eksperimentų schema pateikta 3 pav.



**3 pav.** Pirmo ir antro tyrimų etapo eksperimentų vykdymo schema

## 2.2. Pirmo tyrimų etapo eksperimento vykdymo metodika

### 2.2.1. Tiriamos karvės, tiriamų karvių grupių sudarymo principai

Veršiamosios bokse karvės buvo laikomos ant gilaus šiaudų kraiko iki 6 parų po apsiveršavimo, vėliau – perkeliamos į šviežiapienių karvių grupę. Pagal bendrovėje patvirtintą šviežiapienių karvių metritų profilaktikos planą visoms apsiveršavusioms karvėms antrą parą po veršiamosios buvo matuojama temperatūra. Karvėms, kurioms buvo nustatoma didesnė nei 38,9°C rektinė temperatūra, profilaktiškai buvo leidžiami antibiotikai.

Prisitaikant prie bendrovėje vykdytos šviežiapienių karvių metritų profilaktikos schemos buvo formuojamos eksperimento tiriamųjų ir kontrolinių karvių grupės, atrenkant be distocijų apsiveršavusias karves, kurioms 2 parą po veršiamosios nebuvo nustatyta matomų išorinių lytinių organų pakitimų, o rektinė temperatūra buvo didesnė nei 38,9°C. Prieš sudarant tiriamųjų ir kontrolinių karvių grupes 10 karvių, kurioms nustatytas metritas, 2 parą po veršiamosios iš gimdos buvo paimtas mėginys bakteriologiniam tyrimui. Laboratorijoje buvo išskirti metrito sukėlėjai – *Escherichia coli* ir *Fusobacterium necrophorum*. Titruojant nustatyta, kad jie labiausiai jautrūs buvo ceftiofuro hidrochloridui (difuzijos juosta – 22 mm). Todėl metritų profilaktikai buvo parinktas veiksmingiausias antibakterinis preparatas Excenel RTU.

Sudarytos 4 tiriamųjų ir kontrolinių karvių grupės:

- I – kontrolinė teigiama, gydytų antibiotikais (n=95);
- II – tiriamoji, stimuliuotų ŽILŠ (n=55);
- III – tiriamoji, gydytų antibiotikais ir stimuliuotų ŽILŠ (n=65);
- IV – kontrolinė neigiama (n=55).

### 2.2.2. ŽILŠ stimuliacijos poveikio reprodukcinei karvių funkcijai įvertinimas

Kontrolinės teigiamos (I grupės) ir III tiriamosios grupės karvėms 3 paras iš eilės nuo 2 iki 4 paros po veršiamosios vieną kartą per parą į raumenis buvo leidžiama po 12 ml Excenel RTU (ceftiofuro hidrochlorido 50 mg/ml). II ir III tiriamųjų grupių karvėms gimdos ir kiaušidžių stimuliacija ŽILŠ buvo vykdoma lazerio aparatu Laser STP-99 (Rusija), kurio skleidžiamų šviesos bangų ilgis 870–970 nm, spinduliuotės galia – 65,93 J/cm<sup>2</sup>, dažnio diapazonas nuo 20 iki 2000 Hz, impulsų trukmė – apie 1 s. Stimuliuojama buvo 10 parų iš eilės nuo 2 iki 11 paros po apsiveršavimo, vieną kartą per

parą po 3 minutes, lėtai keičiant ŽILŠ prietaiso padėtį, stimuliuojant 40x50 cm (2000 cm<sup>2</sup>) kryžiaus srities plotą, 5 cm atstumu nuo odos paviršiaus. Kontrolinės neigiamos grupės karvėms 2–4 parą po apsiveršiavimo į raumenis kasdien buvo leidžiama po 12 ml fiziologinio 0,9 % natrio chlorido tirpalo. Tiriamųjų ir kontrolinių karvių grupėse taikytas metritų profilaktikos metodas pateiktas 2 lentelėje.

**2 lentelė.** Tiriamųjų ir kontrolinių karvių metritų profilaktikos metodai

| Grupės Nr. | Grupės pavadinimas  | Tiriamų karvių skaičius (n) | Metritų profilaktikos metodas                                                                     |
|------------|---------------------|-----------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------|
| I          | Kontrolinė teigiama | 95                          | Excenel RTU po 12 ml; 1xd., 3 d. iš eilės                                                         |
| II         | Tiriamoji           | 55                          | Stimuliacija ŽILŠ 1 x d., po 3 min., 10 d. iš eilės                                               |
| III        | Tiriamoji           | 65                          | Excenel RTU po 12 ml; 1xd., 3 d. iš eilės;<br>Stimuliacija ŽILŠ 1 x d., po 3 min., 10 d. iš eilės |
| IV         | Kontrolinė neigiama | 55                          | Fiziologinis 0,9 % natrio chlorido tirpalas po 12 ml, 1xd., 3 d. iš eilės                         |

Diagnozuojant metritus buvo vadovautasi Sheldon ir kitų mokslininkų (2006) teiginiu, kad gyvuliai gali būti apibūdinami kaip sergantys klinikiniu metritu, jei neturi sisteminių susirgimo požymių, tačiau iki 21 paros po apsiveršiavimo iš padidėjusios jų gimdos per makštį išteka pūlingos išskyros. Eksperimento metu visose tiriamųjų ir kontrolinių karvių grupėse buvo fiksuojami klinikinių metritų, gimdos atonijų, mastitų ir viškinimo sistemos sutrikimų atvejai.

Visos eksperimentinės karvės, kurioms 10–15 parą po apsiveršiavimo buvo nustatyti klinikinio metrito požymiai, buvo gydomos skirtingas antiseptines ir antibakterines veikliąsias medžiagas turinčiais preparatais, nurodytais 3 lentelėje. Veterinariniai preparatai buvo leidžiami vieną kartą per parą kas 7 paras, kiekvieną kitą kartą imant kitas veikliąsias medžiagas turinčius preparatus. Klinikiniu metritu sergančioms karvėms tarp antiseptinių ar antibakterinių preparatų leidimo papildomai į raumenis buvo leidžiamas PGF2 $\alpha$  analogas ir oksitonas. Gydytas tęsiamas tol, kol atsistatydavo gimdos tonusas ir nebuvo nustatomos pūlingos išskyros iš gimdos.

Ūmių metritų atvejais, kai temperatūra karvėms pakildavo virš 39°C, ženkliai sumažėdavo primelžiamo pieno kiekis ir matydavosi gausios

pūlingos išskyros iš gimdos, gydymas buvo pradedamas antiseptiniais preparatais. Lengvesniais atvejais gydyti buvo pradedama antibakteriniais vaistais. Eksperimento metu buvo fiksuojama metritų gydymo trukmė (laikas nuo pirmų metrito požymių pasirodymo iki klinikinių požymių išnykimo).

**3 lentelė.** Klinikinių metritų gydymui naudoti antiseptiniai ir antibakteriniai preparatai

| Eil. Nr. | Veterinarinio preparato pavadinimas | Preparato forma                           | Kokybinė ir kiekybinė sudėtis                                   |
|----------|-------------------------------------|-------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------|
| 1.       | IDOFOAM                             | Antiseptinės purškiamosios gimdos putos   | 0,2 g jodo; 0,4 g kalio jodido; 45,2 g pagalbinių medžiagų      |
| 2.       | JODOUTER                            | Antiseptinis gimdos tirpalas              | 100 ml tirpalo 10 g (10 %) jodo povidono                        |
| 3.       | FATROXIMIN                          | Antibakterinės, putojančios gimdos ovulės | 4 g ovulėje yra 300 mg rifaksimino; iki 4 g pagalbinių medžiagų |
| 4.       | PHARMASIN                           | Antibakterinis injekcinis tirpalas        | 1 ml tirpalo yra 200 mg tilozino; pagalbinių medžiagų           |
| 5.       | CLAMOXYL METRITIS                   | Antibakterinė gimdos suspensija           | Viename švirkšte (21,3 g) yra 0,84 g amoksicilino (trihidrato)  |

Tiriamųjų ir kontrolinių karvių reprodukcinė funkcija vertinta pagal kompiuterinėje bandos valdymo programoje DairyPlan C21 (Vokietija) fiksuotus reprodukcijos rodiklius. Analizuojami reprodukcijos rodikliai ir jų vertinimo reikšmės pateikti 4 lentelėje.

**4 lentelė. Reprodukcijos rodikliai ir jų reikšmė**

| Eil. Nr. | Reprodukcijos rodikliai                         | Mato vienetas | Reprodukcijos rodiklių reikšmė                                                                  |
|----------|-------------------------------------------------|---------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1.       | Pirmo sėklinimo laikas                          | paros         | Laikotarpis nuo apsiveršavimo iki pirmojo sėklinimo                                             |
| 2.       | Servis periodas                                 | paros         | Laikotarpis nuo pirmojo sėklinimo iki apsivaisinimo (Dayyani et al., 2013)                      |
| 3.       | Apsivaisinimo po pirmo sėklinimo indeksas       | %             | Apsivaisinusių karvių skaičius po pirmo sėklinimo                                               |
| 4.       | Sėklinimo indeksas                              | kartai        | Sėklinimų skaičius vienam veršingumui                                                           |
| 5.       | Veršiamosi–apsivaisinimo periodas               | paros         | Laikotarpis nuo apsiveršavimo iki apsivaisinimo                                                 |
| 6.       | Veršingumo indeksas                             | %             | Veršingomis tapusių karvių skaičius                                                             |
| 7.       | Brokavimo indeksas dėl reprodukcinio sutrikimo, | %             | Išbrokuotų karvių skaičius dėl reprodukcinio sutrikimo, atsiradusių po paskutinio apsiveršavimo |

### 2.3. Antro tyrimų etapo eksperimento vykdymo metodika

#### 2.3.1. Tiriamos karvės, tiriamų karvių grupių sudarymo principai

Tiriamosios (n=32) ir kontrolinės karvės (n=32) eksperimentui buvo atrinkamos po ultragarsinio karvių gimdos ir kiaušidžių tyrimo. Kiaušides tyrėme ultragarsiniu skeneriu Digital Diagnostic Ultrasound Devices (HG 9300, Caresono Technology Co., Kinija, Ltd) 7 Mhz dažniu, naudodami linijinį rektinį keitiklį.

Tiriant ultragarsu buvo įsitikinta, kad yra įvykusi gimdos involiucija, gimdoje nėra uždegiminio skysčio, kiaušidėse – cistų ar kitų patologinių pakitimų, kiaušintakiuose – nėra sąaugų ar uždegiminių procesų. Eksperimentui buvo atrinktos tik kliniškai sveikos karvės, be funkcinio reprodukcinio sutrikimo, jei jų kiaušidėse buvo didesnis nei 10 mm dydžio geltonkūnis ir nebuvo didesnių nei 10 mm dydžio folikulų.

Ultragarsu buvo išmatuotas kiaušidžių plotis, ilgis ir nustatytas jų darinių (geltonkūnių ir folikulų) skaičius. Kiaušidžių dydį (plotą) nustatėme pagal jų pločio ir ilgio sandaugą, ir apskaičiavome tiriamųjų ir kontrolinių karvių vidutinius kiaušidžių dydžius prieš superovuliaciją (5 lentelė).

**5 lentelė.** Tiriamų ir kontrolinių karvių (n=64), vidutinis kiaušidžių dydis(mm<sup>2</sup>) prieš superovuliaciją

| Vidutinis kairės pusės kiaušidžių (n=64) dydis (mm <sup>2</sup> ) | Vidutinis dešinės pusės kiaušidžių (n=64) dydis (mm <sup>2</sup> ) | Vidutinis kairės ir dešinės pusės kiaušidžių (n=128) dydis (mm <sup>2</sup> ) |
|-------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------|
| $\bar{x} \pm m_x; \sigma$                                         | $\bar{x} \pm m_x; \sigma$                                          | $\bar{x} \pm m_x; \sigma$                                                     |
| 792,22 $\pm$ 44,24; 353,89                                        | 987,63 $\pm$ 64,07; 512,59                                         | 889,92 $\pm$ 39,73; 449,54                                                    |

Superovuliacijos efektyvumo pagal kiaušidžių dydį nustatymui, atsižvelgiant į vidutinį vyraujančių dešinės pusės kiaušidžių dydį (987,63 mm<sup>2</sup>) visas tiriamąsias ir kontrolines karves suskirstėme į 3 grupes. Pirmos grupės karvių dešinės pusės kiaušidės buvo 25 % mažesnės, o 3 grupės 25 % didesnės už vidutinio dydžio (987,63 mm<sup>2</sup>) dešinės pusės 2 grupės karvių kiaušides (6 lentelė).

**6 lentelė.** Karvių grupės pagal vyraujančių dešinės pusės kiaušidžių dydį prieš superovuliaciją

| Karvių grupė                                                | Dešinės pusės kiaušidžių dydis prieš superovuliaciją (mm <sup>2</sup> ) |
|-------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------|
| <b>I</b><br>(karvės, turinčios mažas kiaušides)             | <b>&lt; 741,0</b><br>(987,63 mm <sup>2</sup> - 25 %)                    |
| <b>II</b><br>(karvės, turinčios vidutinio dydžio kiaušides) | <b>741,0–1235,0</b><br>(987,63 mm <sup>2</sup> $\pm$ 25 %)              |
| <b>III</b><br>(karvės, turinčios dideles kiaušides)         | <b>&gt; 1235,0</b><br>(987,63 mm <sup>2</sup> + 25 %)                   |

Superovuliacijos efektyvumo ir embrionų išsivystymo bei kokybės įvertinimui sudarytų tiriamųjų ir kontrolinių karvių grupių struktūra pateikta 7 lentelėje. Tiriamų ir kontrolinių karvių skirtumai nurodyti 2.3.2. ir 2.3.3. skyriuose.

**7 lentelė.** II eksperimento tiriamų ir kontrolinių karvių grupių struktūra

| II eksperimento karvės | Karvių grupės |          |           |
|------------------------|---------------|----------|-----------|
|                        | I grupė       | II grupė | III grupė |
| Tiriamoji (n=32)       | n=14          | n=12     | n=6       |
| Kontrolinė (n=32)      | n=12          | n=13     | n=7       |

### 2.3.2. Superovuliacijos sukėlimo be stimuliacijos ŽILŠ metodika

Superovuliaciją be stimuliacijos ŽILŠ sukėlėme kontrolinių grupių karvėms (n=32) preparatu PLUSET (Laboratorios Calier, S.A., Barselona, Spain) išgautu iš kiaulių hipofizės, turinčiu folikulus FSH ir LH santykiu 1:1, karencijos laikas pienui – 0 parų.

Superovuliaciją atlikome pagal 8 lentelėje nurodytą superovuliacijos protokolo schemą (Lafri et al., 2002, Seidel et al., 2003), neatsižvelgiant į karvės lytinio ciklo fazę. Pirmą superovuliacijos parą karvėms buvo aplikuojamas intravagininis implantas CIDR (CIDR<sup>®</sup>, Pfizer, Inc., Belgija), turintis 1,38 g progesterono, karencijos laikas pienui – 0 parų. Keturias paras iš eilės, nuo 6 iki 9 superovuliacijos protokolo paros į raumenis leidome preparatą PLUSET du kartus per parą (ryte ir vakare) su 12 valandų intervalu, mažėjančia koncentracija. Šeštą superovuliacijos protokolo parą ryte ir vakare buvo leidžiama po 4 ml PLUSET tirpalo (140 VV), septintą parą – po 3 ml (105 VV), aštuntą – po 2 ml (70 VV) ir devintą parą 1 ml (35 VV).

Viename mililitre preparato buvo po 35 VV FSH ir LH. Bendra preparato PLUSET dozė 1 tiriamajai karvei sudarė 700 VV FSH ir LH.

Rujos synchronizacijai aštuntą superovuliacijos parą papildomai į raumenis leidome PGF<sub>2α</sub> analogą – kloprostenolį (Bioveta, Plc., Čekijos Respublika), karencijos laikas pienui – 0 dienų, po 2 ml ryte ir vakare, su 12 val. pertrauka. Devintą superovuliacijos sukėlimo parą ryte išėmėme intravagininį implantą ir 10–11 parą sėklinome praėjus 12 valandų nuo pirmų rujos požymių pasirodymo (2 kartus su 12 val. pertrauka). Praėjus 168 valandoms nuo pirmo sėklinimo (18–19 parą pagal superovuliacijos protokolą) embrionus išgavome nechirurginiu būdu (2.3.4. skyr.).

Superovuliacijos protokolo schema pateikta 8 lentelėje.

**8 lentelė. Superovuliacijos protokolo schema**

| Eil. Nr. | Superovuliacijos protokolo paros | Atliktos procedūros                                                                                      |
|----------|----------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1.       | 1 para                           | Išvedamas intravagininis implantas CIDR, turintis 1,38 g progesterono.                                   |
| 2.       | 6 para                           | Rytas Į raumenis suleista: 4 ml PLUSET (140 VV FSH ir LH).                                               |
|          |                                  | Vakaras Į raumenis suleista: 4 ml PLUSET (140 VV FSH ir LH).                                             |
| 3.       | 7 para                           | Rytas Į raumenis suleista: 3 ml PLUSET (105 VV FSH ir LH).                                               |
|          |                                  | Vakaras Į raumenis suleista: 3 ml PLUSET (105 VV FSH ir LH).                                             |
| 4.       | 8 para                           | Rytas Į raumenis suleista:<br>- 2 ml kloprostenolio;<br>- 2 ml PLUSET (70 VV FSH ir LH).                 |
|          |                                  | Vakaras Į raumenis suleista:<br>- 2 ml kloprostenolio;<br>- 2 ml PLUSET (70 VV FSH ir LH).               |
| 5.       | 9 para                           | Rytas - Išimamas intravagininis implantas CIDR;<br>- Į raumenis suleista: 1 ml PLUSET (35 VV FSH ir LH); |
|          |                                  | Vakaras Į raumenis suleista: 1 ml PLUSET (35 VV FSH ir LH).                                              |
| 6.       | 10–11 para                       | Atliekamas dirbtinis sėklinimas.                                                                         |
| 7.       | 18–19 para                       | Vykdomas embrionų plovimas.                                                                              |

### 2.3.3. Superovuliacijos sukėlimo su ŽILŠ stimuliacija metodika

Superovuliaciją su ŽILŠ stimuliacija tiriamųjų grupių karvėms (n=32) sukėlėme vadovaudamiesi superovuliacijos protokolo schema (žr. 8 lent.), o embrionus išgavome nechirurginiu būdu (2.3.4. skyr.).

Superovuliacijos sukėlimo metu tiriamųjų grupių karvėms papildomai buvo vykdoma kiaušidžių stimuliacija lazerio aparatu Laser STP–99, kurio skleidžiamų šviesos bangų ilgis 870–970 nm, spinduliuotės galia – 65,93 J/cm<sup>2</sup>, dažnio diapazonas nuo 20 iki 2000 Hz, impulsų trukmė – apie 1 sekundę.

Tiriamų karvių kiaušidžių stimuliacija ŽILŠ *in vivo* buvo pradedama nuo pirmos superovuliacinio gydymo paros, švitinant vieną kartą per parą po 3 minutes, 10 parų iš eilės. Stimuliacija buvo vykdoma lėtai keičiant prietaiso padėtį 40x50 cm (2000 cm<sup>2</sup>) os *sacrum* srities plote, 5 cm atstumu nuo odos paviršiaus (4 pav.). Paskutinį kartą stimuliuojama ŽILŠ buvo rujos metu praėjus valandai po sėklinimo.



**4 pav.** Tiriamųjų karvių stimuliacijos ŽILŠ plotas

#### 2.3.4. Embrionų išgavimo metodika

18–19 superovuliacijos protokolo parą (žr. 8 lent.) embrionų plovimo metu karvės fiksuotos specialiose staklėse, kuriose priekinėms kojoms buvo įrengta 20 cm paaukštinta platforma. Karvių tarpvietės sritis ir vulva nuplauti šiltu vandeniu ir dezinfekuoti 0,1 % kalio permanganato tirpalu. Siekiant išvengti raumenų spazmų ir defekacijos embrionų plovimo metu karvėms atlikta žemoji epidūrinė sakrinė anestezija (į stuburo kanalą tarp I ir II uodegos slankstelio leista po 4 ml (20 mg/ml) lidokaino hidroklorido, (Sanitas, Lietuva).

Embrionai išplauti nechirurginiu būdu naudojant 70 cm ilgio sterilų guminių dviejų kanalų Rush kateterį (Minitube, Vokietija). Kiekvieną karvę pradėdavome plauti nuo dešiniojo gimdos rago, todėl kateteris per makštį pirmiausia buvo įvedamas į dešinįjį gimdos ragą. Kateterio galui esant gimdos rago vidurinėje dalyje, per oro kanalą švirkštu buvo pripučiama oro į kateterio balionėlį. Balionėliui išsipūtus buvo uždaromas rago spindis, kad pro kateterio galą leidžiama embrionų plovimo terpė negrįžtų į makštį. Kitu embrionų plovimo kanalu į plaunamą gimdos ragą buvo suleidžiama/išleidžiama embrionų plovimo terpė. Embrionų plovimui naudojome BoviFlush (su galvijų serumo albuminu ir antibiotikais) terpę (Minitube, Vokietija). Vienai karvei sunaudojome 1000 ml terpės (po 500 ml kiekvieno gimdos rago plovimui).

Pirmus 3 kartus kiekvieną kartą buvo suleidžiama/išleidžiama iki 30 ml plovimo terpės. Vėliau terpės kiekis buvo didinamas iki 40–60 ml. Plovimo metu, suleidus į gimdos ragą plovimo terpę, rektiškai rankos pirštais buvo švelniai masažuojamas gimdos ragas ir stebima, kad po kiekvieno terpės suleidimo būtų surinkta tiek pat terpės, kiek jos buvo suleista. Analogiška procedūra buvo atliekama ir plaunant embrionus iš kairiojo gimdos rago.

Embrionų plovimo terpė su išplautais embrionais buvo filtruojama per 70 µm skersmens porų filtrą (Minitube, Vokietija), kuris sulaiko 150–200 µm skersmens embrionus ir praleidžia kai kurias somatines ląsteles ir nereikalingus likučius. Filtrų turinys buvo perpiltas į specialią Petri lėkštelę (Minitube, Vokietija), kurios išorinis dugno paviršius padalytas į 10x10 mm tyrimo plotelius. Embrionų plovimo terpės filtras dar 3 kartus po 20 ml buvo praskalaujamas embrionų laikymo BoviHold (Minitube, Vokietija) 37°C temperatūros terpe, kuri surinkta į antrą Petri lėkštelę. Uždengtos Petri lėkštelės su turiniu buvo laikomos ant 37°C temperatūrą palaikančios termostatinės plokštės 30 min. Po sedimentacijos ant dugno nusėdusių embrionų ieškojome 15–20x padidiniu stereomikroskopu (Stereo-zoom microscope, with phototube, factor 7x - 45x, Minitube, Vokietija), peržiūrėdami Petri lėkštelių dugno tyrimo plotelius. Surasti embrionai mikropipete buvo perkelti į 37°C temperatūros embrionų laikymo terpę BoviHold tolesniam embrionų kokybės įvertinimui. Kiekvieną Petri lėkštelę su embrionų plovimo terpe tikrino du tyrėjai po du kartus.

#### 2.3.5. Superovuliacijos efektyvumo nustatymo metodika

Superovuliacijos efektyvumas tiriamųjų ir kontrolinių karvių grupėse buvo nustatomas 18–19 superovuliacijos protokolo (žr. 8 lent.) parą embrionų plovimo metu siekiant įvertinti:

- ŽILŠ stimuliacijos *in vivo* poveikį superovuliacijai;
- sąsajas tarp kiaušidžių dydžio, jų padėties kūno pusės atžvilgiu prieš superovuliaciją ir superovuliacijos rezultatų.

ŽILŠ stimuliacijos poveikio superovuliacijos efektyvumui tyrimas vykdytas analizuojant ir lyginant tarpusavyje tiriamųjų ir kontrolinių grupių karvių superovuliacijos efektyvumo rodiklius:

1. Kiaušidžių dydžio prieš/po superovuliacijos skirtumą;
2. Folikulų ir geltonkūnių skaičių po superovuliacijos;
3. Embrionų išėgą.

Sąsajos tarp kiaušidžių dydžio, jų padėties kūno pusės atžvilgiu prieš superovuliaciją ir superovuliacijos rezultatų nustatytos lyginant visus tris

superovuliacijos efektyvumo rodiklius tarp kontrolinių karvių grupių ir nustatant statistinį ryšį tarp kiaušidžių dydžio prieš superovuliaciją ir kiaušidžių dydžio, geltonkūnių, folikulų ir embrionų skaičiaus po superovuliacijos.

Pirmųjų dviejų superovuliacijos efektyvumo rodiklių nustatymui embrionų plovimo metu ultragarsu buvo matuojamas kiaušidžių dydis ir skaičiuojami didesni nei 10 mm geltonkūniai ir folikulai.

Superovuliacijos efektyvumas pagal kiaušidžių dydį po superovuliacijos buvo vertinamas lyginant karvių kairės ir dešinės pusės kiaušidžių vidutinius dydžius prieš/po superovuliacijos.

Superovuliacijos efektyvumas pagal geltonkūnių ir folikulų skaičių buvo vertinamas lyginant kairės ir dešinės pusės kiaušidžių vidutinį geltonkūnių ir folikulų skaičių po superovuliacijos kontrolinių karvių grupėse ir tarp tiriamųjų ir kontrolinių karvių grupių.

Embrionų išeiga nustatyta skaičiuojant išplautų ir transplantacijai tinkamų embrionų skaičių (žr. 2.3.4. ir 2.3.6. skyr.).

#### 2.3.6. Embrionų išsivystymo, kokybės ir išeigos nustatymo metodika

ŽILŠ stimuliacijos įtaka embrionų išsivystymui, kokybei ir išeigai tiriamųjų ir kontrolinių karvių grupėse buvo nustatoma 18–19 superovuliacijos protokolo (žr. 8 lent.) parą embrionų plovimo metu.

Išplautų embrionų kokybė buvo nustatoma vadovaujantis Bo ir Mapletoft (2013) embrionų kokybės vertinimo metodika, pagal kurią embrionai yra klasifikuojami skaitmeninių kodų sistema, atsižvelgiant į vystymosi stadiją (nuo 1 iki 9 stadijos) ir kokybę (nuo 1 iki 4 klasės). Galvijų embrionų kokybės vertinimas atliktas 45x padidiniu stereomikroskopu (Stereo-zoom microscope, with phototube, factor 7x–45x, Minitube, Vokietija). Vertinami embrionai iš Petri lėkštelės mikropipete buvo perkelti į sterilią embrionų kultivavimo lėkštelę, kurios šulinėliai pripildyti embrionų laikymo terpe BoviHold (Minitube, Vokietija). Neaštriomis stiklinėmis mentelėmis buvo atskiriamos prie skaidriojo embriono apvalkalo prilipusios somatinės ląstelės ar pašalinės dalelės ir mikropipete embrionai buvo perkelti į kitą šulinėlį su švaria BoviHold terpe.

Vertinant embriono kokybę buvo kreipiamas dėmesys į tai, kad bendras galvijų embriono skersmuo (150–190  $\mu\text{m}$ , įskaitant ir skaidriąją zoną, kurios storis būna nuo 12 iki 15  $\mu\text{m}$ ) turi išlikti beveik nepakitęs embrionui vystantis nuo neapvaisintos kiaušialąstės iki blastocistos stadijos.

Vertinant embrionų išsivystymą ir gyvybingumą, pirmiausia buvo nustatyta, kurioje vystymosi stadijoje yra vertinamas embrionas. Embrionų vystymosi stadijos pateiktos 9 lentelėje.

**9 lentelė. Galvijų embrionų vystymosi stadijos**

| <b>Embrionų vystymosi stadijos, pavadinimas</b>                        | <b>Požymiai</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |
|------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>1. Neapvaisintas ovocitas</b>                                       | Visa vienos ląstelės vidaus erdvė užpildyta skaidriąja zona. Po apvaisinimo vienos ląstelės embrionas yra šiek tiek atitrauktas nuo skaidriosios zonos, kuri iš visų pusių supa embriono masę.                                                                                                                                      |
| <b>2. Zigota</b>                                                       | Embriono masė sudaryta iš besidalijančių 2–12 ląstelių.                                                                                                                                                                                                                                                                             |
| <b>3. Morulė</b>                                                       | Embriono masė sudaryta iš nemažiau kaip 16 ląstelių. Blastomerus vieną nuo kito sunku atskirti. Ląstelinė embrionų masė užima didžiąją dalį perivitelinio tarpo.                                                                                                                                                                    |
| <b>4. Kompaktiška morulė</b>                                           | Blastomerai susilieja, suformuodami vientisą (kompaktišką) masę. Ląstelinė embrionų masė užima nuo 60 iki 70 % perivitelinio tarpo.                                                                                                                                                                                                 |
| <b>5. Ankstyvoji blastocista</b>                                       | Embrionas suformuoja skysčio užpildytą ertmę ar blastocelę. Masė užima 70–80 % perivitelinio tarpo. Sunku atskirti vidinę ląstelių masę nuo trofoblastinių ląstelių masės.                                                                                                                                                          |
| <b>6. Blastocista</b>                                                  | Ryškus skirtumas tarp išorinio trofoblasto sluoksnio ir tamsesnės labiau vientisos vidinės ląstelių masės. Blastocelės šiame etape gerai matomos, jos su embriono mase užima didžiąją perivitelinio tarpo dalį. Galima diferenciacija tarp trofoblasto ir vidinės ląstelių masės.                                                   |
| <b>7. Išplėsta (angl. expanded) blastocista</b>                        | Stipriai padidėja bendras embriono skersmuo, tuo pačiu metu lygiagrečiai retėja skaidrusis apvalkalas į maždaug vieną trečdalį savo pradinio storio.                                                                                                                                                                                |
| <b>8. Išsivysčiusi (angl. hatched) blastocista</b>                     | Embrionai šioje vystymosi stadijoje gali būti visiškai praradę skaidriąją zoną. Išsivysčiusios blastocistos gali būti sferinės su gerai apibrėžta blastocеле arba gali būti suirusios. Identifikuoti išsivysčiusias blastocistas gali būti sudėtinga, jei jos iš naujo nesiplečia ir jei nepasirodo akivaizdus žiedas su antspaudu. |
| <b>9. Išplėstai išsivysčiusi (angl. expanding hatched) blastocista</b> | Išsivysčiusios blastocistos palieka skaidriąją zoną ir patenka į gimdos spindį.                                                                                                                                                                                                                                                     |

Atsižvelgiant į embrionų vystymosi stadijų ypatumus, embrionų kokybė buvo nustatyta pagal 10 lentelėje aprašomus morfologinius embrionų vientisumo požymius.

**10 lentelė. Galvijų embrionų kokybės klasės**

| <b>Embrionų kokybės klasės Nr., pavadinimas</b> | <b>Požymiai</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |
|-------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>1. Puikūs arba geri</b>                      | Turi simetrišką sferinę masę su atskirais blastomerais, kurie yra vienodo dydžio, spalvos ir tankio. Embriono išsivystymas atitinka vystymosi stadijai būdingus požymius, embriono ląstelinė masė turi būti gyvybinga. Pažeidimai turėtų būti nedideli, sveikos ląstelinės masės turi būti ne mažiau kaip 85 %. Skaidrioji zona yra lygi, negali turėti įgaubtų arba plokščių paviršių.<br>Šios klasės embrionai tinkami užšaldymui/atšildymui. Rekomenduojama juos naudoti komerciniais tikslais. |
| <b>2. Patenkinami</b>                           | Šie embrionai turi vidutinio sunkumo pažeidimų bendroje formoje, masėje, dydyje, spalvoje. Gali būti randami pakitimai atskirų ląstelių tankyje. Ne mažiau kaip 50 % visos embriono masės turėtų būti nepažeista. Šių embrionų išgyvenimas po užšaldymo/atšildymo procedūrų yra mažesnis nei 1 klasės embrionų, tačiau gautų veršingumų procentas yra pakankamas, jei embrionai perkeliama šviežūs.                                                                                                |
| <b>3. Prasti</b>                                | Tokie embrionai turi didelių embriono formos, masės arba dydžio, spalvos ir atskirų ląstelių tankumo pažeidimų. Ne mažiau kaip 25 % embriono masės turi būti nepažeista. Šie embrionai neišgyvena užšalimo/atšildymo procedūros metu ir gautų veršingumų procentas yra žemesnis nei naudojant šviežius embrionus.                                                                                                                                                                                  |
| <b>4. Negyvi arba degeneruoti</b>               | Tai gali būti ovocitų ar vienos ląstelės embrionai. Jie nėra gyvybingi ir turi būti sunaikinti.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |

ŽILŠ stimuliacijos įtaka embrionų išsivystymui buvo analizuojama išplautus (7 parą po sėklinimo) tiriamųjų ir kontrolinių grupių karvių embrionus suskirsčius pagal šias išsivystymo stadijas:

1. Neapvaisintas ovocitas.
2. Kompaktiška morulė.
3. Ankstyvoji blastocista.
4. Blastocista.

Analizuojant gautus duomenis tiriamųjų ir kontrolinių karvių grupėse buvo lyginami išplautų embrionų skaičiai pagal jų išsivystymo stadijas ir pagal kiekvienos embrionų išsivystymo stadijos embrionų dalį, tenkančią vienam išplautam embrionui.

ŽILŠ stimuliacijos įtaka embrionų kokybei vertinta lyginant tiriamųjų ir kontrolinių grupių karvių vidutinį embrionų skaičių pagal jų kokybės klases (10 lentelė).

Skaičiuojant embrionų išeigą buvo vertinami du rodikliai:

1. Išplautų embrionų skaičius (1–4 kokybės klasės suminis išplautų embrionų skaičius);
2. Transplantacijai tinkamų embrionų skaičius (1–2 kokybės klasės išplautų embrionų skaičius).

#### **2.4. Statistinio duomenų įvertinimo metodika**

Eksperimentų tyrimų duomenys buvo analizuojami SPSS programiniu paketu (SPSS for Windows 15, SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Rezultatai laikyti patikimais jei  $p \leq 0,05$ .

Duomenų analizei panaudota aprašomoji ir daugiafaktorinė statistika (ANOVA), koreliacijos koeficientas apskaičiuotas pagal Pearson. Apskaičiuoti kiekybinių kintamųjų reikšmių aritmetiniai vidurkliai ( $\bar{x}$ ), aritmetinių vidurkių paklaidos ( $m_x$ ) ir vidutiniai kvadratiniai nuokrypiai ( $\sigma$ ). Kiekybinių kintamųjų reikšmių aritmetinių vidurkių skirtumo patikimumas ( $p$ ) nustatytas Stjudento t-testu (Juozaitienė, Kerzienė, 2001).

### 3. TYRIMŲ REZULTATAI

#### 3.1. ŽILŠ stimuliacijos poveikis reprodukcinei karvių funkcijai

3.1.1. Tiriamų ir kontrolinių karvių sergamumas metritais ir metritų gydymo trukmė

Pagal 11 lentelėje pateiktus duomenis matosi, kad kiekvienoje tiriamojoje ir kontrolinėje karvių grupėje buvo nustatyta klinikinių metritų. Daugiausiai metritu sirgusių karvių (virš 65 %) nustatyta IV kontrolinėje neigiamoje karvių grupėje, mažiausiai – III tiriamojoje grupėje karvių, gydytų antibiotikais ir stimuliuotų ŽILŠ (58,4 %). Tačiau gauti rezultatai parodė, kad sergamumo metritais skirtumas tarp tiriamųjų ir kontrolinių karvių grupių nėra statistikai reikšmingas ( $p=0,705$ ).

**11 lentelė. Karvių sergamumas metritais ir jų gydymo trukmė**

| Karvių grupės                                           | Sergamumas metritais |       | Metritų gydymo trukmė (paromis) |          |       |
|---------------------------------------------------------|----------------------|-------|---------------------------------|----------|-------|
|                                                         | n                    | %     | $\bar{x}$                       | $\sigma$ | $m_x$ |
| <b>I<sup>a</sup> (n = 95)</b><br>(kontrolinė teigiama)  | 57                   | 60.0  | 14.0* <sup>a</sup>              | 5.23     | 1.67  |
| <b>II<sup>b</sup> (n = 55)</b><br>(tiriamoji)           | 34                   | 61.8  | 19.4* <sup>b</sup>              | 7.46     | 2.33  |
| <b>III<sup>c</sup> (n = 65)</b><br>(tiriamoji)          | 38                   | 58.4  | 12.3* <sup>c</sup>              | 2.40     | 0.75  |
| <b>IV<sup>d</sup> (n = 55)</b><br>(kontrolinė neigiama) | 36                   | 65.45 | 20.0* <sup>d</sup>              | 5.31     | 1.64  |

\*  $p < 0,05$  (a:b, a:c, b:c, c:d)

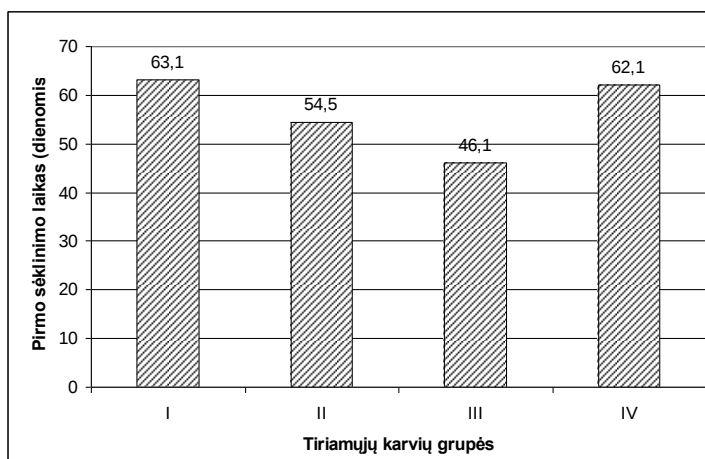
\*  $p > 0,05$  (a:d, b:d)

Trumpiausias vidutinis metritų gydymo laikas nustatytas profilaktiškai antibiotikais gydytoje ir papildomai ŽILŠ stimuliuotoje III tiriamųjų karvių grupėje. Jis buvo 62,6 % ( $p < 0,05$ ) trumpesnis nei IV kontrolinėje neigiamoje, 13,8 % ( $p < 0,05$ ) trumpesnis nei I kontrolinėje teigiamoje grupėje ir 57,7 % ( $p < 0,05$ ) trumpesnis nei II tiriamojoje karvių grupėje. Metritų gydymo trukmė II tiriamojoje karvių grupėje buvo 3,1 % ( $p > 0,05$ ) trumpesnė nei IV kontrolinėje neigiamoje, tačiau 38,6 % ilgesnė ( $p < 0,05$ ) nei I kontrolinėje teigiamoje karvių grupėje. I kontrolinėje teigiamoje karvių

grupėje metritų gydymo trukmė buvo 42,9 % ( $p>0,05$ ) trumpesnė nei IV kontrolinėje neigiamoje karvių grupėje.

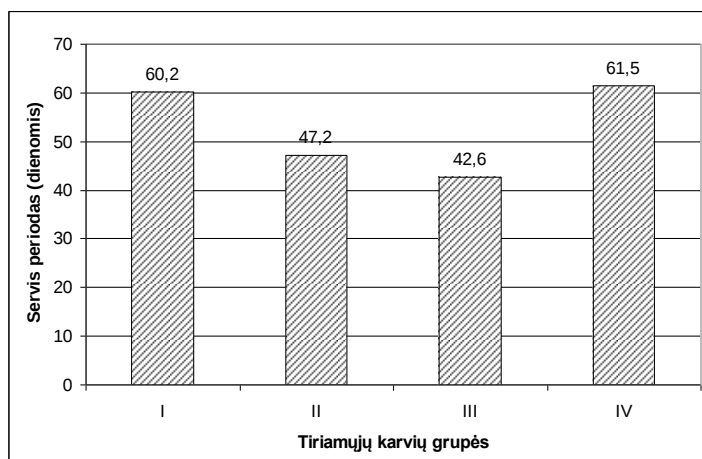
### 3.1.2. Tiriamų ir kontrolinių karvių reprodukcijos rodiklių analizė

Vidutinis pirmo sėklinimo laikas po apsiveršiavimo (5 pav.) buvo ilgiausias I kontrolinėje teigiamoje ir IV kontrolinėje neigiamoje karvių grupėse. Trumpiausias – III tiriamojoje karvių grupėje, kuris lyginant su IV kontroline neigiama karvių grupe buvo vidutiniškai 34,7 % (16,0 parų) trumpesnis ( $p<0,05$ ) ir 36,9 % (17 parų) trumpesnis ( $p<0,05$ ) nei I kontrolinėje teigiamoje grupėje. II tiriamojoje karvių grupėje pirmo sėklinimo laikas buvo 13,9 % (7,6 paros) trumpesnis ( $p>0,05$ ) lyginant su IV kontroline neigiama karvių grupe.



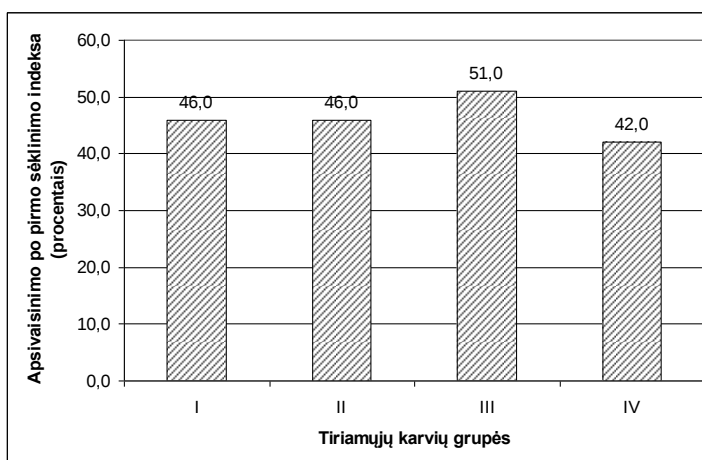
**5 pav.** Tiriamų ir kontrolinių karvių grupių pirmo sėklinimo laikas

Teigiamas stimuliacijos ŽILŠ poveikis nustatytas lyginant kontrolinių ir tiriamųjų karvių grupių servis periodą (6 pav.). II tiriamos karvių grupės servis periodas buvo atitinkamai 30,3 % (14,3 paros) ir 27,5 % (13 parų) ( $p>0,05$ ) trumpesnis lyginant su IV kontroline neigiama ir I kontroline teigiama karvių grupe. Dar ryškesnis stimuliacijos ŽILŠ poveikis pagal servis periodo trukmę nustatytas III tiriamųjų karvių grupėje. Šios grupės karvių vidutinė servis periodo trukmė buvo atitinkamai 44,4 % (18,9 paros) ( $p>0,05$ ) ir 41,3 % (17,6 paros) ( $p>0,05$ ) trumpesnė lyginant su IV kontroline neigiama ir I kontroline teigiama karvių grupe ir 10,8 % (4,6 paros) ( $p>0,05$ ) trumpesnė už II tiriamos karvių grupės vidutinę servis periodo trukmę.



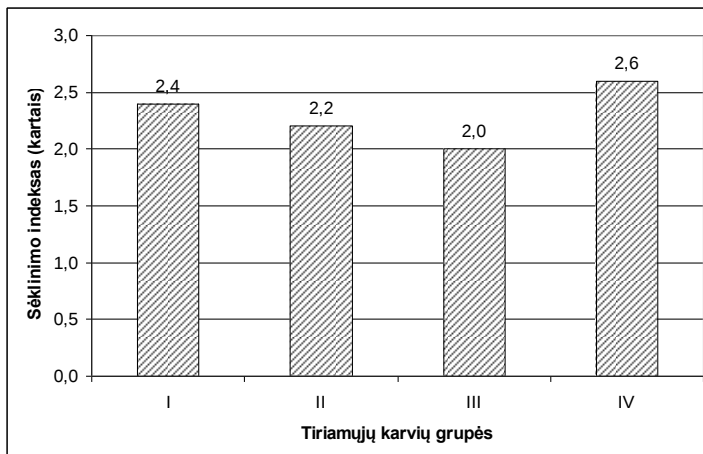
**6 pav.** *Tiriamų ir kontrolinių karvių grupių servis periodas*

Apsivaisinimo po pirmo sėklinimo indeksas (7 pav.) I kontrolinėje teigiamoje ir II tiriamojoje karvių grupėse buvo vienodas. Jis buvo 9,5 % ( $p>0,05$ ) didesnis nei IV kontrolinėje neigiamoje karvių grupėje, bet 10,9 % ( $p>0,05$ ) mažesnis nei III tiriamojoje karvių grupėje. Ryškiausias stimuliacijos ŽILŠ poveikis apvaisinimo po pirmo sėklinimo rodikliams matomas lyginant III tiriamosios ir IV kontrolinės neigiamos karvių grupių duomenis. III tiriamojoje karvių grupėje šis rodiklis 21,4 % ( $p>0,05$ ) yra didesnis nei kontrolinėje neigiamoje karvių grupėje. Tačiau tyrimo metu nenustatyta statistiškai patikimos koreliacijos ( $p=0,806$ ) tarp tiriamų, kontrolinių karvių grupių ir apvaisinimo po pirmo sėklinimo indekso.



**7 pav.** *Tiriamų ir kontrolinių karvių apvaisinimo po pirmo sėklinimo indeksas*

Stimuliacija ŽILŠ turėjo teigiamą, tačiau statistikai nepatikimą poveikį sėklinimo indeksui. Abiejose tiriamosiose karvių grupėse sėklinimo indeksas buvo mažesnis nei IV kontrolinėje neigiamoje ar I kontrolinėje teigiamoje karvių grupėse (8 pav.). Ryškiausias stimuliacijos ŽILŠ teigiamas poveikis pagal sėklinimo indeksą matomas III tiriamojoje karvių grupėje. Lyginant su IV kontroline neigiama ir I kontroline teigiama karvių grupėmis sėklinimo indeksas šioje grupėje buvo atitinkamai 30 % ( $p>0,05$ ) ir 20 % mažesnis ( $p>0,05$ ).

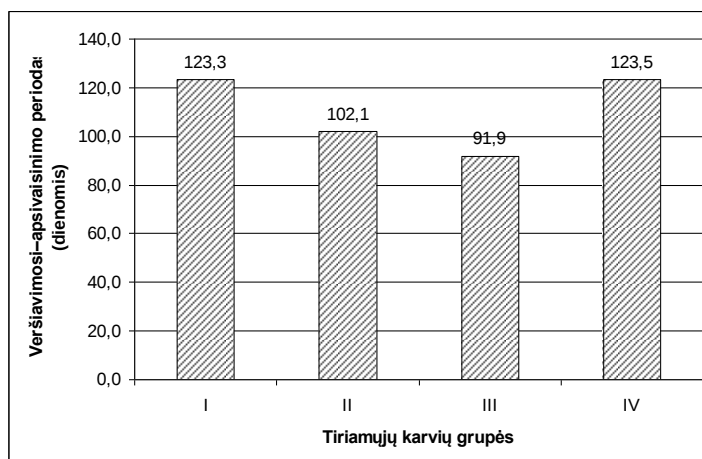


**8 pav.** Tiriamųjų ir kontrolinių karvių sėklinimo indeksas

Statistikai reikšmingas stimuliacijos ŽILŠ poveikis nustatytas veršiavimosi–apsivaissinimo periodui, kuris buvo beveik vienodas abiejose kontrolinių karvių grupėse, tačiau ženkliai ilgesnis nei III ar II tiriamųjų karvių grupėse (9 pav.).

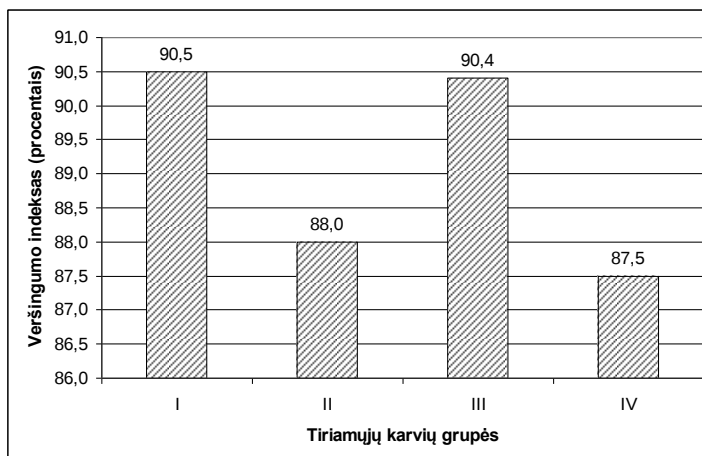
Didžiausias stimuliacijos ŽILŠ teigiamas efektas nustatytas III tiriamojoje grupėje, kurios karvių veršiavimosi–apsivaissinimo periodas buvo 34,17 % (31,4 paros,  $p<0,05$ ) trumpesnis nei I kontrolinėje teigiamoje ir 34,39 % (31,6 paros,  $p<0,05$ ) trumpesnis nei IV kontrolinėje neigiamoje karvių grupėje. II tiriamosios karvių grupės vidutinis veršiavimosi–apsivaissinimo periodas buvo daugiau kaip 21 parą (21 %) ( $p>0,05$ ) trumpesnis lyginant su abiejomis kontrolinėmis karvių grupėmis.

Didžiausias karvių skaičius su optimaliu 80–100 parų periodu nuo apsiveršiavimo iki apsivaissinimo buvo nustatytas III tiriamojoje karvių grupėje. Šioje grupėje nenustatyta atvejų, kad periodas nuo apsiveršiavimo iki apsivaissinimo būtų ilgesnis nei 160 parų. Mažiausiai, iki 100 parų po apsiveršiavimo, apvaisintų karvių buvo nustatyta IV kontrolinėje neigiamoje karvių grupėje.



**9 pav.** *Tiriamų ir kontrolinių karvių veršiamosi – apsivaisinimo periodas*

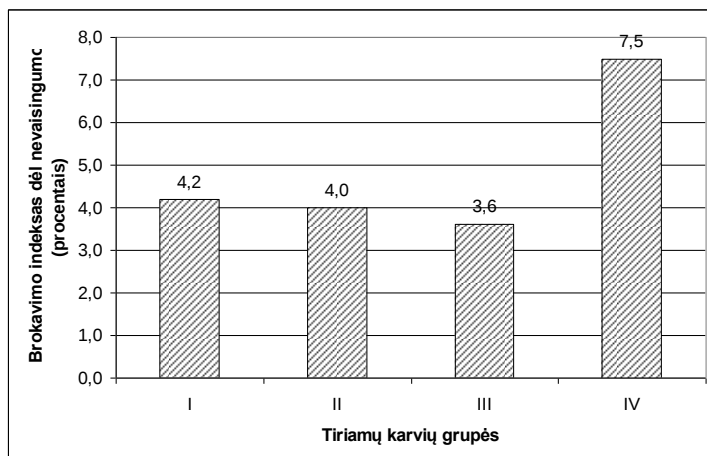
Veršingumo indeksas buvo beveik vienodas (skyrėsi 3 %) tiriamųjų ir kontrolinių karvių grupėse (10 pav.). Tyrimo metu nenustatyta statistiškai patikimos ( $p=0,904$ ) koreliacijos tarp tiriamų, kontrolinių karvių grupių ir veršingumo indekso.



**10 pav.** *Tiriamų ir kontrolinių karvių veršingumo indeksas*

Brokavimo indeksas dėl reprodukcinų sutrikimų (atsiradusių po paskutinio apsiveršavimo) buvo didžiausias IV kontrolinėje neigiamoje karvių grupėje (11 pav.). Eksperimento metu nustatyta, kad dėl reprodukcinų sutrikimų mažiausiai karvių buvo išbrokuota III tiriamojoje karvių grupėje, tačiau nebuvo nustatyta statistiškai patikimos koreliacijos

( $p=0,701$ ) tarp tiriamų, kontrolinių karvių grupių ir brokavimo indekso dėl reprodukcinio sutrikimo.



**11 pav.** Tiriamų ir kontrolinių karvių brokavimo indeksas dėl reprodukcinio sutrikimo

Analizuojant tiriamų ir kontrolinių karvių grupių duomenis papildomai buvo pastebėtas teigiamas stimuliacijos ŽILŠ poveikis. Lyginant su IV kontroline neigiama karvių grupe abiejų tiriamųjų grupių karvėms, profilaktiškai stimuliuotoms ŽILŠ, buvo nustatyta mažiau mastitų, gimdos atonijų ir virškinimo sutrikimų: 21,1 % ( $p<0,05$ ) II tiriamojoje ir 27,5 % ( $p<0,05$ ) – III tiriamojoje karvių grupėse.

### 3.2. Superovuliacijos efektyvumas pagal kiaušidžių dydžio prieš ir po superovuliacijos skirtumą

Tiriamų (superovuliacijos metu stimuliuotų ŽILŠ) ir kontrolinių (superovuliacija sukelta be ŽILŠ stimuliacijos) karvių vidutinis kairės pusės kiaušidžių dydis prieš superovuliaciją buvo 24,7 % ( $p<0,05$ ) mažesnis už vidutinį dešinės pusės kiaušidžių dydį.

Vidutinis tiriamųjų karvių dešinės pusės kiaušidžių dydis prieš superovuliaciją buvo 22,8 % ( $p>0,05$ ), o kontrolinių 26,6 % ( $p>0,05$ ) didesnis už tiriamųjų ir kontrolinių karvių kairės pusės kiaušidžių vidutinį dydį. Tiriamųjų ir kontrolinių I ir II grupių karvių kairės ir dešinės pusės kiaušidžių dydis prieš superovuliaciją buvo panašus, tačiau III grupės dešinės ir kairės pusės kiaušidžių dydžiai ženkliai skyrėsi. Tiriamosios III

grupės karvių dešinės pusės kiaušidės buvo 28,5 % ( $p<0,05$ ) didesnės už kairės pusės kiaušides, o kontrolinės III grupės karvių atitinkamai – 54,6 % ( $p<0,001$ ) (12, 13 lentelės).

**12 lentelė.** Vidutiniai tiriamų karvių grupių kiaušidžių dydžiai prieš ir po superovuliacijos

| Karvių grupės  | Prieš superovuliaciją              |                                      | Po superovuliacijos                  |                                     |
|----------------|------------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|-------------------------------------|
|                | Kairė kiaušidė                     | Dešinė kiaušidė                      | Kairė kiaušidė                       | Dešinė kiaušidė                     |
|                | $\bar{x} \pm m_x; \sigma$          | $\bar{x} \pm m_x; \sigma$            | $\bar{x} \pm m_x; \sigma$            | $\bar{x} \pm m_x; \sigma$           |
| I grupė        | 454,8±41,6 <sup>a</sup><br>155,64  | 565,3±46,01 <sup>f</sup><br>172,15   | 1991,8±50,96 <sup>j</sup><br>190,67  | 2355,1±72,35 <sup>o</sup><br>270,69 |
| II grupė       | 922,5±44,54 <sup>b</sup><br>154,31 | 1086,0±36,03 <sup>g</sup><br>124,81  | 2301,8±70,79 <sup>k</sup><br>245,22  | 2899,5±84,55 <sup>p</sup><br>292,89 |
| III grupė      | 1372,0±93,37 <sup>c</sup><br>228,7 | 1762,5±118,19 <sup>h</sup><br>289,51 | 3006,7±138,68 <sup>l</sup><br>339,70 | 3588,0±76,32 <sup>r</sup><br>186,94 |
| Vidut.         | 802,2±68,46 <sup>d</sup><br>387,29 | 985,0±85,14 <sup>i</sup><br>481,64   | 2298,3±78,01 <sup>m</sup><br>441,3   | 2790,4±93,56 <sup>s</sup><br>529,24 |
| Iš viso vidut. | 893,6±55,4 <sup>e</sup><br>443,23  |                                      | 2544,4±67,91 <sup>n</sup><br>543,29  |                                     |

( $p<0,001$ ) – e:n, d:m, i:s, j:o, a:j, f:o, k:p, b:k, g:p, c:l, h:r, j:l, o:p, o:r, p:r, m:s; ( $p<0,01$ ) – l:r, j:k, k:l; ( $p<0,05$ ) – c:h

Kiaušidžių dydžio skirtumas tiriamosiose ir kontrolinėse karvių grupėse išliko ir po superovuliacijos. Vidutinis tiriamųjų karvių dešinės pusės kiaušidžių dydis po superovuliacijos buvo 21,4 % ( $p<0,001$ ) didesnis už vidutinį kairės pusės kiaušidžių dydį, o kontrolinių karvių grupėse skirtumas tarp dešinės ir kairės pusės vidutinio kiaušidžių dydžio buvo beveik 6 % ryškesnis ir sudarė 27,3 % ( $p<0,01$ ). Nepriklausomai nuo padėties kūno pusės atžvilgiu, tiriamųjų karvių kiaušidžių dydis po superovuliacijos vidutiniškai padidėjo 2,9 karto ( $p<0,001$ ), tačiau kontrolinių karvių kiaušidžių reakcija į superovuliaciją buvo 16,5 % intensyvesnė, jos vidutiniškai padidėjo 3,2 karto ( $p<0,001$ ).

**13 lentelė.** Vidutiniai kontrolinių karvių grupių kiaušidžių dydžiai prieš ir po superovuliacijos

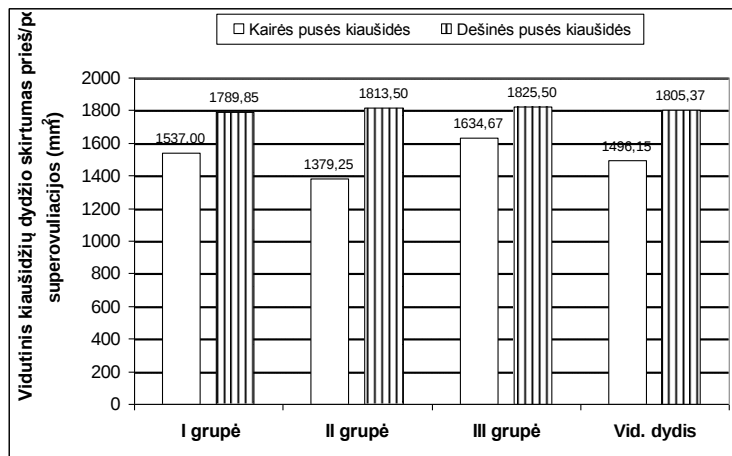
| Karvių grupės        | Prieš superovuliaciją               |                                     | Po superovuliacijos                  |                                      |
|----------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|
|                      | Kairė kiaušidė                      | Dešinė kiaušidė                     | Kairė kiaušidė                       | Dešinė kiaušidė                      |
|                      | $\bar{x} \pm m_x, \sigma$           | $\bar{x} \pm m_x, \sigma$           | $\bar{x} \pm m_x, \sigma$            | $\bar{x} \pm m_x, \sigma$            |
| <b>I grupė</b>       | 449,1±43,56 <sup>a</sup><br>150,91  | 503,5±55,83 <sup>f</sup><br>193,41  | 2083,5±81,50 <sup>j</sup><br>282,32  | 2612,8±114,75 <sup>o</sup><br>270,69 |
| <b>II grupė</b>      | 852,1±30,51 <sup>b</sup><br>110,00  | 953,8±37,31 <sup>g</sup><br>134,53  | 2303,2±134,38 <sup>k</sup><br>484,52 | 2818,9±135,27 <sup>p</sup><br>487,74 |
| <b>III grupė</b>     | 1223,9±43,01 <sup>c</sup><br>113,78 | 1892,3±64,86 <sup>h</sup><br>171,60 | 3454,3±200,88 <sup>l</sup><br>531,47 | 4674,7±97,41 <sup>r</sup><br>257,72  |
| <b>Vidut.</b>        | 782,3±57,10 <sup>d</sup><br>322,98  | 990,2±97,14 <sup>i</sup><br>549,53  | 2472,6±120,17 <sup>m</sup><br>679,77 | 3147,6±162,37 <sup>s</sup><br>918,48 |
| <b>Vidut. karvės</b> | 886,3±57,41 <sup>e</sup><br>459,25  |                                     | 2810,1±108,84 <sup>n</sup><br>870,75 |                                      |

(**p<0,001**) – e:n, d:m, i:s, l:r, a:j, f:o, c:h, b:k, g:p, c:l, h:r, j:l, k:l, o:r, p:r;

(**p<0,01**) – j:o, m:s; (**p<0,05**) –k:p

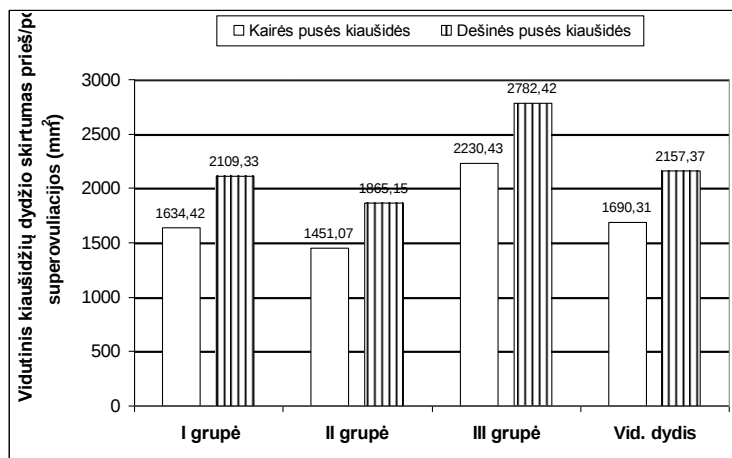
Pagal kiaušidžių dydžio pokyčius prieš/po superovuliacijos į superovuliaciją intensyviausiai reagavo vidutiniškai 4–5 kartus padidėjusios mažiausias kiaušides prieš superovuliaciją turėjusių tiriamųjų ir kontrolinių I grupės karvių kairės ir dešinės pusės kiaušidės. Tiriamųjų II ir III grupės karvių kiaušidės po superovuliacijos vidutiniškai padidėjo 2–2,7 karto, o kontrolinių II ir III grupės karvių kiaušidžių padidėjimas po superovuliacijos svyravo nuo 2,5 iki 3 kartų.

Visose tiriamųjų karvių grupėse dešinės pusės kiaušidžių reakcija į superovuliaciją pagal vidutinius jų dydžio skirtumus (mm<sup>2</sup>) prieš/po superovuliacijos buvo intensyvesnė už kairės pusės kiaušidžių, vidutiniškai 20,7 % (**p<0,001**) (ryškiausia II grupėje – 31,5 % (**p<0,01**), silpniausia III grupėje – 11,7 % (**p>0,05**)). Intensyviausiai į superovuliaciją reagavusios III grupės tiriamų karvių dešinės pusės kiaušidės padidėjo 32,4 % (**p<0,05**) daugiau už silpniausiai į superovuliaciją reagavusių II grupės tiriamų karvių kairės pusės kiaušides (12 pav.).



**12 pav.** Kiaušidžių reakcija į superovuliaciją tiriamų karvių grupėse pagal jų dydžio skirtumą (mm<sup>2</sup>) prieš/po superovuliacijos

Kontrolinių karvių grupėse dešinės pusės kiaušidžių reakcija į superovuliaciją pagal vidutinius jų dydžio skirtumus (mm<sup>2</sup>) prieš/po superovuliacijos buvo intensyvesnė už kairės pusės kiaušidžių vidutiniškai 27,63 % ( $p < 0,001$ ) (ryškiausia II grupėje – 28,5 % ( $p < 0,05$ ), silpniausia I grupėje – 12,8 % ( $p < 0,001$ )). Intensyviausiai į superovuliaciją reagavusios III grupės kontrolinių karvių dešinės pusės kiaušidės padidėjo 91,8 % ( $p < 0,001$ ) daugiau už silpniausiai į superovuliaciją reagavusių II grupės kontrolinių karvių kairės pusės kiaušides (13 pav.).

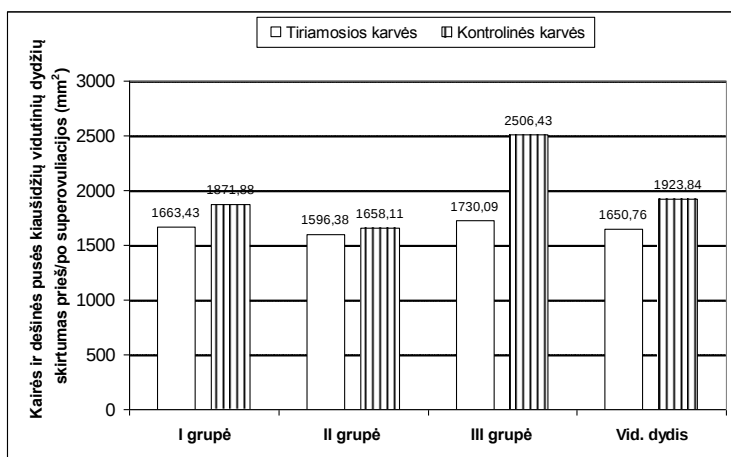


**13 pav.** Kiaušidžių reakcija į superovuliaciją kontrolinių karvių grupėse pagal jų dydžio skirtumą (mm<sup>2</sup>) prieš/po superovuliacijos

Palyginus tiriamųjų ir kontrolinių karvių kiaušidžių reakciją į superovuliaciją pagal vidutinį kiaušidžių dydžio skirtumą ( $\text{mm}^2$ ) prieš/po superovuliacijos nustatyta, kad kontrolinės karvės į superovuliaciją reagavo vidutiniškai 16,5 % ( $p < 0,001$ ) intensyviau. Didžiausias skirtumas nustatytas tarp tiriamųjų ir kontrolinių karvių III grupės dešinės pusės kiaušidžių, kurios kontrolinių karvių grupėje padidėjo vidutiniškai 52,4 % ( $p < 0,001$ ) daugiau nei tiriamųjų karvių. Kontrolinių karvių dešinės pusės kiaušidės superovuliacijos metu padidėjo vidutiniškai 19,5 % ( $p < 0,001$ ) intensyviau už tiriamųjų karvių tos pačios pusės kiaušides, o kontrolinių karvių kairės pusės kiaušidės buvo vidutiniškai 13 % ( $p < 0,05$ ) didesnės už analogiškas tiriamųjų karvių kiaušides.

Lyginant tiriamųjų ir kontrolinių karvių grupes pagal karvės abiejų kiaušidžių vidutinio dydžio pokytį prieš/po superovuliacijos nustatyta, kad superovuliacija tiriamųjų karvių grupėse nors ir buvo mažiau intensyvi, tačiau ji buvo ženkliai tolygesnė nei kontrolinių karvių grupėse.

Pagal šį rodiklį daugiausiai padidėjusios tiriamųjų III grupės karvių kiaušidės buvo vidutiniškai 8,4 % ( $p > 0,05$ ) didesnės už mažiausiai padidėjusias tiriamųjų II grupės karvių kiaušides. Kontrolinėse grupėse daugiausiai ir mažiausiai padidėjusios kiaušidės atitinkamai III ir II kontrolinių karvių grupėse vidutiniškai skyrėsi 51,2 % ( $p < 0,001$ ) (14 pav.).



**14 pav.** Tiriamųjų ir kontrolinių karvių abiejų kiaušidžių vidutinio dydžio skirtumai ( $\text{mm}^2$ ) prieš/po superovuliacijos pagal karvių grupes

Nustatyta, kad tiriamųjų ir kontrolinių karvių kiaušidžių dydis prieš superovuliaciją stipriai ir statistiškai reikšmingai siejasi su kiaušidžių dydžiu po superovuliacijos (14 lentelė). Tiriamųjų karvių kairės ir dešinės pusės

kiaušidžių dydis prieš superovuliaciją atitinkamai 9,1 % ( $p<0,01$ ) ir 3,2 % ( $p<0,01$ ) stipriau siejasi su dešinės pusės kiaušidės dydžiu po superovuliacijos nei su kairės, tačiau skirtumas minimalus ir statistiškai nereikšmingas. Kontrolinių karvių kairės pusės kiaušidės dydis prieš superovuliaciją 1,2 % ( $p<0,01$ ) stipriau siejasi su kairės pusės kiaušidės dydžiu po superovuliacijos nei su dešinės. Tiriamųjų ir kontrolinių karvių dešinės pusės kiaušidės dydis prieš superovuliaciją atitinkamai 3,2 % ( $p<0,01$ ) ir 4,7 % ( $p<0,01$ ) stipriau siejasi su dešinės pusės tiriamųjų ir kontrolinių karvių kiaušidės dydžiu po superovuliacijos nei su kairės. Kairės pusės kiaušidės dydis po superovuliacijos 7,86 % ( $p<0,01$ ) stipriau koreliuoja su kontrolinių karvių dešinės pusės kiaušidės dydžiu po superovuliacijos nei su tiriamųjų karvių dešinės pusės kiaušidės dydžiu.

**14 lentelė.** Statistinis ryšys tarp tiriamų ir kontrolinių karvių kiaušidžių dydžio prieš ir po superovuliacijos

| Tiriamų/kontrolinių karvių kiaušidės dydis          | Pearson koreliacija | Kiaušidžių dydis po superovuliacijos |                        |                       |                        |
|-----------------------------------------------------|---------------------|--------------------------------------|------------------------|-----------------------|------------------------|
|                                                     |                     | Tiriamųjų karvių                     |                        | Kontrolinių karvių    |                        |
|                                                     |                     | Kairės pusės kiaušidė                | Dešinės pusės kiaušidė | Kairės pusės kiaušidė | Dešinės pusės kiaušidė |
| Kairės pusės kiaušidės dydis prieš superovuliaciją  | r                   | 0,835 *                              | 0,911 *                | 0,843 *               | 0,833 *                |
| Dešinės pusės kiaušidės dydis prieš superovuliaciją | r                   | 0,884 *                              | 0,912 *                | 0,875 *               | 0,916 *                |
| Kairės pusės kiaušidės dydis po superovuliacijos    | r                   | —                                    | 0,840 *                | —                     | 0,906 *                |

\* – koreliacijos koeficiento reikšmingumas ( $p<0,01$ );

### 3.3. Superovuliacijos efektyvumas pagal folikulų ir geltonkūnių skaičių po superovuliacijos

### 3.3.1. Superovuliacijos efektyvumas pagal folikulų skaičių po superovuliacijos

Vidutinis folikulų skaičius kairėje kiaušidėje po superovuliacijos buvo 20,12 % ( $p>0,05$ ) mažesnis už vidutinį tiriamųjų karvių dešinės pusės kiaušidžių folikulų skaičių ir 26,29 % ( $p<0,05$ ) mažesnis už vidutinį kontrolinių karvių folikulų skaičių dešinėje kiaušidėje. Daugiausiai folikulų po superovuliacijos rasta mažiausiose tiriamųjų ir kontrolinių I grupės karvių dešinės pusės kiaušidėse. Mažiausiai – tiriamųjų ir kontrolinių II grupės karvių dešinės pusės kiaušidėse. Tiriamųjų I grupės karvių dešinės pusės kiaušidėse nustatyta 86,9 % ( $p<0,01$ ), o kontrolinių I grupės karvių dešinės pusės kiaušidėse 94 % ( $p<0,001$ ) daugiau folikulų nei atitinkamai tiriamųjų ir kontrolinių II grupių karvių dešinės pusės kiaušidėse. Statistiškai patikimas skirtumas nustatytas lyginant tiriamųjų ir kontrolinių I grupės karvių kairės ir dešinės pusės kiaušidžių folikulų skaičių. Tiriamųjų I grupės karvių dešinėje kiaušidėje nustatyta 72,3 % ( $p<0,01$ ), o kontrolinių tos pačios grupės karvių – 79,3 % ( $p<0,01$ ) daugiau folikulų nei atitinkamai tiriamųjų ir kontrolinių I grupės karvių kairės pusės kiaušidėse (15 lentelė).

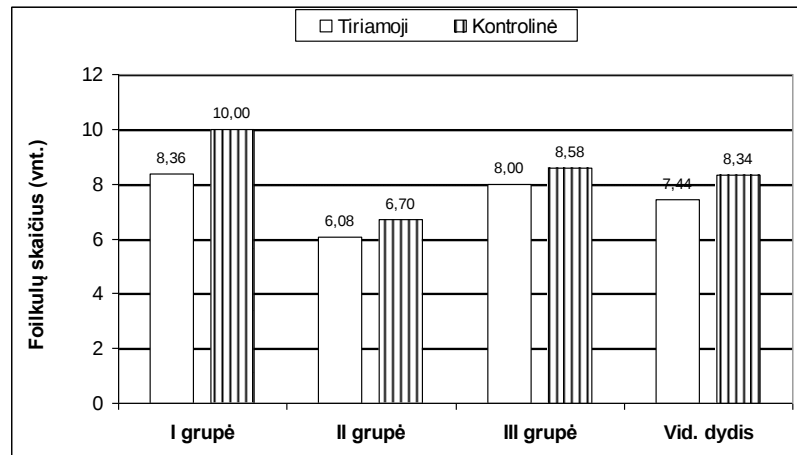
**15 lentelė.** Folikulų skaičius tiriamų ir kontrolinių grupių karvių kairės ir dešinės pusės kiaušidėse po superovuliacijos

| Karvių grupės    | Tiriamosios karvės             |                                | Kontrolinės karvės             |                                |
|------------------|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|
|                  | Kairė kiaušidė                 | Dešinė kiaušidė                | Kairė kiaušidė                 | Dešinė kiaušidė                |
|                  | $\bar{x} \pm m_x; \sigma$      | $\bar{x} \pm m_x; \sigma$      | $\bar{x} \pm m_x; \sigma$      | $\bar{x} \pm m_x; \sigma$      |
| <b>I grupė</b>   | 3,07±0,50 <sup>a</sup><br>1,86 | 5,29±0,56 <sup>b</sup><br>2,09 | 3,58±0,50 <sup>d</sup><br>1,73 | 6,42±0,66 <sup>f</sup><br>2,27 |
| <b>II grupė</b>  | 3,25±0,49<br>1,71              | 2,83±0,52 <sup>c</sup><br>1,80 | 3,38±0,37<br>1,33              | 3,31±0,38 <sup>g</sup><br>1,38 |
| <b>III grupė</b> | 4,33±0,49<br>1,21              | 3,67±0,67<br>1,63              | 4,43±0,69<br>1,81              | 4,14±0,51 <sup>h</sup><br>1,35 |
| <b>Vidut.</b>    | 3,38±0,30<br>1,72              | 4,06±0,38<br>2,17              | 3,69±0,28 <sup>e</sup><br>1,60 | 4,66±0,39 <sup>i</sup><br>2,22 |

( $p<0,001$ ) – f:g; ( $p<0,01$ ) – a:b, d:f, b:c; ( $p<0,05$ ) – e:i, f:h.

Tiriamosiose karvių grupėse nustatyta vidutiniškai 12,1 % ( $p>0,05$ ) mažiau folikulų nei kontrolinėse karvių grupėse. Vidutinis folikulų skaičius iš vienos karvės kiaušidžių po superovuliacijos visose kontrolinių karvių grupėse buvo didesnis nei tiriamųjų karvių (15 pav.). Pagal šį rodiklį

tiriamųjų ir kontrolinių I grupės karvių kiaušidėse buvo nustatyta atitinkamai 37,5 % ( $p < 0,05$ ) ir 49,2 % ( $p < 0,01$ ) daugiau folikulų nei tiriamųjų ir kontrolinių II grupės karvių kiaušidėse.



**15 pav.** Vidutinis folikulų skaičius iš vienos karvės kiaušidžių po superovuliacijos tiriamųjų ir kontrolinių karvių grupėse

Nustatytos silpnos statistinės koreliacijos tarp tiriamų ir kontrolinių karvių kiaušidžių dydžio prieš superovuliaciją ir folikulų skaičiaus po superovuliacijos. Kuo didesnės tiriamųjų ir kontrolinių karvių kairės ar dešinės pusės kiaušidės prieš superovuliaciją, tuo daugiau rasta folikulų kairėje ir tuo mažiau folikulų dešinėje kiaušidėje po superovuliacijos. Ši tendencija kontrolinės grupės karvių statistškai patikima. Atlikus superovuliaciją, tiriamųjų ir kontrolinių karvių grupėse pastebima panaši tendencija: kuo didesnės abiejų pusių kiaušidės po superovuliacijos, tuo daugiau folikulų randama kairėje kiaušidėje ir tuo mažiau dešinėje. Kontrolinių karvių ši tendencija išreikšta silpniau (16 lentelė).

**16 lentelė.** Statistinis ryšys tarp tiriamų ir kontrolinių karvių kiaušidžių dydžio prieš/po superovuliacijos ir folikulų skaičiaus kiaušidėse po superovuliacijos

| Tiriamų/kontrolinių karvių kiaušidės dydis          | Pearson koreliacija | Folikulų skaičius po superovuliacijos |                        |                       |                        |
|-----------------------------------------------------|---------------------|---------------------------------------|------------------------|-----------------------|------------------------|
|                                                     |                     | Tiriamųjų karvių                      |                        | Kontrolinių karvių    |                        |
|                                                     |                     | Kairės pusės kiaušidė                 | Dešinės pusės kiaušidė | Kairės pusės kiaušidė | Dešinės pusės kiaušidė |
| Kairės pusės kiaušidės dydis prieš superovuliaciją  | r                   | 0,330                                 | -0,338                 | 0,190                 | -0,490 **              |
| Dešinės pusės kiaušidės dydis prieš superovuliaciją | r                   | 0,350 *                               | -0,317                 | 0,235                 | -0,388 *               |
| Kairės pusės kiaušidės dydis po superovuliacijos    | r                   | 0,341                                 | -0,144                 | 0,364 *               | -0,149                 |
| Dešinės pusės kiaušidės dydis po superovuliacijos   | r                   | 0,228                                 | -0,401 *               | 0,179                 | -0,172                 |

\* – koreliacijos koeficiento reikšmingumas ( $p < 0,05$ );

\*\* – koreliacijos koeficiento reikšmingumas ( $p < 0,01$ );

### 3.3.2. Superovuliacijos efektyvumas pagal geltonkūnių skaičių po superovuliacijos

Vidutinis geltonkūnių skaičius tiriamųjų ir kontrolinių karvių dešinės pusės kiaušidėse po superovuliacijos buvo didesnis už vidutinį geltonkūnių skaičių kairės pusės kiaušidėse atitinkamai 60 % ( $p < 0,001$ ) tiriamosiose grupėse ir 44,5 % ( $p < 0,01$ ) kontrolinių karvių grupėse. Visų tiriamųjų ir kontrolinių grupių karvių dešinės pusės kiaušidėse po superovuliacijos buvo nustatytas didesnis vidutinis geltonkūnių skaičius nei kairės pusės kiaušidėse ir tendencija, kad kuo didesnė dešinės pusės kiaušidė prieš superovuliaciją, tuo daugiau joje bus randama geltonkūnių po superovuliacijos. Didžiausiose tiriamų karvių III grupės dešinės pusės kiaušidėse rasta 38,7 % ( $p > 0,05$ ) ir 71,5 % ( $p < 0,05$ ) daugiau geltonkūnių nei atitinkamai II ir I grupės tiriamų karvių dešinės pusės kiaušidėse, o kontrolinių III grupės karvių dešinėse kiaušidėse buvo 40,5 % ( $p > 0,05$ ) ir 110,75 % ( $p < 0,05$ ) daugiau geltonkūnių nei atitinkamose II ir I grupės kontrolinių karvių dešinės pusės kiaušidėse (17 lentelė).

**17 lentelė.** Geltonkūnių skaičius tiriamų ir kontrolinių grupių karvių kairės ir dešinės pusės kiaušidėse po superovuliacijos

| Karvių grupės           | Tiriamosios karvės             |                                 | Kontrolinės karvės             |                                |
|-------------------------|--------------------------------|---------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|
|                         | Kairė kiaušidė                 | Dešinė kiaušidė                 | Kairė kiaušidė                 | Dešinė kiaušidė                |
|                         | $\bar{x} \pm m_x; \sigma$      | $\bar{x} \pm m_x; \sigma$       | $\bar{x} \pm m_x; \sigma$      | $\bar{x} \pm m_x; \sigma$      |
| <b>I grupė</b>          | 4,29±0,51 <sup>a</sup><br>1,90 | 5,93±0,80 <sup>f</sup><br>3,00  | 3,50±0,23 <sup>j</sup><br>0,80 | 4,00±0,48 <sup>o</sup><br>1,65 |
| <b>II grupė</b>         | 3,83±0,78 <sup>b</sup><br>2,69 | 7,33±0,43 <sup>g</sup><br>1,50  | 3,54±0,72 <sup>k</sup><br>2,60 | 6,00±0,54 <sup>p</sup><br>1,96 |
| <b>III grupė</b>        | 6,50±0,76 <sup>c</sup><br>1,87 | 10,17±1,25 <sup>h</sup><br>3,06 | 5,71±0,61 <sup>l</sup><br>1,60 | 8,43±1,23 <sup>r</sup><br>3,26 |
| <b>Vidut.</b>           | 4,53±0,42 <sup>d</sup><br>2,37 | 7,25±0,52 <sup>i</sup><br>2,92  | 4,00±0,36 <sup>m</sup><br>2,05 | 5,78±0,48 <sup>s</sup><br>2,71 |
| <b>Vidut. iš karvės</b> | 5,89±0,37 <sup>e</sup><br>2,97 |                                 | 4,89±0,32 <sup>n</sup><br>2,55 |                                |

(p<0,001) – d:i; (p<0,01) – m:s, b:g, j:l; (p<0,05) – k:p, c:h, i:s, o:p, o:r, k:l, a:c, f:h, b:c, e:n

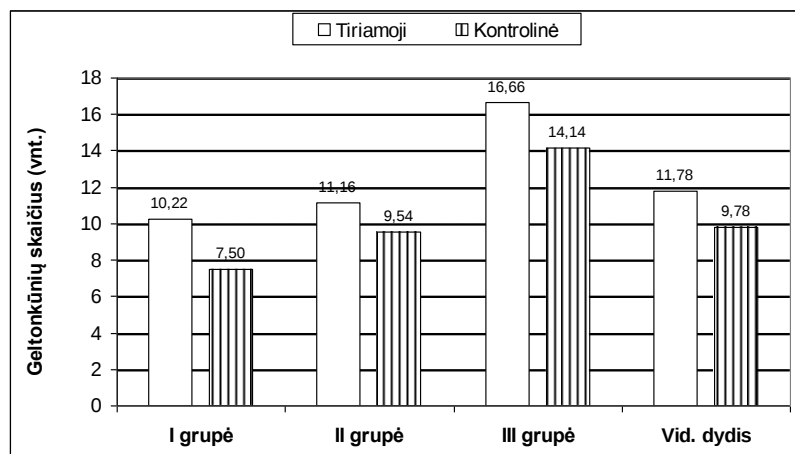
Tiriamųjų III grupės karvių kairės pusės kiaušidėse geltonkūnių rasta vidutiniškai 69,7 % (p<0,05) ir 51,5 % (p<0,05) daugiau nei atitinkamai tiriamųjų II ir I grupių karvių kairės pusės kiaušidėse, o kontrolinių III grupės karvių kairės pusės kiaušidėse geltonkūnių buvo vidutiniškai 61,3 % (p<0,05) ir 63,1 % (p<0,01) daugiau nei atitinkamai kontrolinių II ir I grupių karvių kairės pusės kiaušidėse.

Tiriamųjų III grupės karvių dešinės pusės kiaušidėse buvo nustatyta vidutiniškai 56,5 % (p<0,05) daugiau geltonkūnių nei tos pačios grupės kairėje kiaušidėje, o tiriamojoje II grupėje vidutiniškai 91,4 % (p<0,01) daugiau geltonkūnių dešinėje nei kairėje kiaušidėse.

Tiriamųjų karvių grupėse po superovuliacijos vienos karvės kiaušidėse vidutiniškai nustatyta 20,5 % (p<0,05) daugiau geltonkūnių nei kontrolinių karvių kiaušidėse. Tiriamųjų karvių dešinėje kiaušidėje rasta vidutiniškai 25,4 % (p<0,05) geltonkūnių daugiau nei dešinėje kontrolinių karvių kiaušidėje. Kairėje tiriamųjų karvių kiaušidėje nustatyta vidutiniškai 13,25 % (p>0,05) daugiau geltonkūnių nei kontrolinių karvių kairės pusės kiaušidėse.

Vidutinis geltonkūnių skaičius iš vienos karvės kiaušidžių po superovuliacijos visose tiriamųjų karvių grupėse buvo didesnis nei kontrolinių karvių (16 pav.). Didžiausias ir mažiausias vidutinis geltonkūnių skaičius iš karvės nustatytas atitinkamai III ir I grupių karvių kiaušidėse,

kuris tiriamųjų karvių grupėse skyrėsi 63 % ( $p < 0,01$ ), o kontrolinių – 88,5 % ( $p < 0,001$ ).



**16 pav.** Vidutinis geltonkūnių skaičius iš vienos karvės kiaušidžių po superovuliacijos tiriamųjų ir kontrolinių karvių grupėse

Nustatyta, kad tiriamųjų ir kontrolinių karvių kairės ir dešinės pusės kiaušidžių dydis prieš ir po superovuliacijos vidutiniškai ir statistiškai reikšmingai siejasi su geltonkūnių skaičiumi po superovuliacijos tiriamųjų karvių dešinės pusės kiaušidėse ir kontrolinių karvių abiejų pusių kiaušidėse.

Dešinės pusės kiaušidės dydis prieš superovuliaciją 48,6 % ( $p < 0,05$ ) stipriau siejasi su dešinės kiaušidės geltonkūnių skaičiumi nei su kairės kiaušidės geltonkūniais po superovuliacijos tiriamųjų karvių grupėse ir atitinkamai 44,6 % ( $p < 0,01$ ) stipriau kontrolinių karvių grupėse. Kairės pusės kiaušidės dydis prieš superovuliaciją irgi stipriau koreliuoja su dešinės kiaušidės geltonkūnių skaičiumi nei su kairės kiaušidės geltonkūniais po superovuliacijos tiriamųjų karvių grupėse 45,7 % ( $p > 0,05$ ) ir atitinkamai 57,7 % ( $p < 0,05$ ) stipriau kontrolinių karvių grupėse.

Dešinės ir kairės kiaušidės dydis prieš superovuliaciją atitinkamai 25,3 % ( $p < 0,01$ ) dešinės ir 42,7 % ( $p < 0,01$ ) kairės kiaušidės stipriau siejasi su dešinės kiaušidės geltonkūniais po superovuliacijos kontrolinių karvių grupėse nei tiriamųjų ir atitinkamai 28,9 % ( $p < 0,05$ ) dešinės ir 31,9 % ( $p > 0,05$ ) kairės kiaušidės stipriau su kairės kiaušidės geltonkūniais po superovuliacijos kontrolinių karvių grupėse nei tiriamųjų.

Dešinės pusės kiaušidės dydis po superovuliacijos 53,6 % ( $p > 0,05$ ) stipriau siejasi su dešinės kiaušidės geltonkūnių skaičiumi nei su kairės

kiaušidės geltonkūniais po superovuliacijos tiriamųjų karvių grupėse ir atitinkamai 20,8 % ( $p<0,01$ ) stipriau kontrolinių karvių grupėse. Kairės kiaušidės dydis po superovuliacijos 34,5 % ( $p<0,05$ ) stipriau siejasi su dešinės kiaušidės geltonkūniais nei su kairės kiaušidės geltonkūniais po superovuliacijos tiriamųjų karvių grupėse ir atitinkamai 13,6 % ( $p<0,01$ ) stipriau kontrolinių karvių grupėse (18 lentelė).

**18 lentelė.** Statistinis ryšys tarp tiriamų ir kontrolinių karvių kiaušidžių dydžio prieš/po superovuliacijos ir geltonkūnių skaičiaus kiaušidėse po superovuliacijos

| Tiriamų/kontrolinių karvių kiaušidės dydis          | Pearson koreliacija | Geltonkūnių skaičius po superovuliacijos |                        |                       |                        |
|-----------------------------------------------------|---------------------|------------------------------------------|------------------------|-----------------------|------------------------|
|                                                     |                     | Tiriamųjų karvių                         |                        | Kontrolinių karvių    |                        |
|                                                     |                     | Kairės pusės kiaušidė                    | Dešinės pusės kiaušidė | Kairės pusės kiaušidė | Dešinės pusės kiaušidė |
| Kairės pusės kiaušidės dydis prieš superovuliaciją  | r                   | 0,326                                    | 0,475 <sup>**</sup>    | 0,430 <sup>*</sup>    | 0,678 <sup>**</sup>    |
| Dešinės pusės kiaušidės dydis prieš superovuliaciją | r                   | 0,364 <sup>*</sup>                       | 0,541 <sup>**</sup>    | 0,469 <sup>**</sup>   | 0,678 <sup>**</sup>    |
| Kairės pusės kiaušidės dydis po superovuliacijos    | r                   | 0,406 <sup>*</sup>                       | 0,546 <sup>**</sup>    | 0,516 <sup>**</sup>   | 0,586 <sup>**</sup>    |
| Dešinės pusės kiaušidės dydis po superovuliacijos   | r                   | 0,349                                    | 0,536 <sup>**</sup>    | 0,559 <sup>**</sup>   | 0,675 <sup>**</sup>    |

\* – koreliacijos koeficiento reikšmingumas ( $p<0,05$ );

\*\* – koreliacijos koeficiento reikšmingumas ( $p<0,01$ ).

### 3.4. Superovuliacijos efektyvumas pagal embrionų išeigą

Daugiausia embrionų išplauta iš didžiausias kiaušides prieš superovuliaciją turėjusių III grupės tiriamųjų ir kontrolinių karvių. Iš tiriamųjų III grupės karvių vidutinis išplautų ir transplantacijai tinkamų embrionų skaičius buvo atitinkamai 61,7 % ( $p<0,001$ ) ir 47,4 % ( $p>0,05$ ) didesnis nei iš tiriamų II grupės karvių ir atitinkamai 194,8 % ( $p<0,001$ ) ir 150,9 % ( $p<0,01$ ) didesnis nei iš tiriamų I grupės karvių. Iš kontrolinių III grupės karvių išplautų ir transplantacijai tinkamų embrionų vidutiniškai

gauta atitinkamai 88,5 % ( $p<0,001$ ) ir 60,5 % ( $p<0,05$ ) daugiau nei iš kontrolinių II grupės karvių ir atitinkamai 269,3 % ( $p<0,001$ ) ir 214,5 % ( $p<0,001$ ) daugiau nei iš kontrolinių I grupės karvių (19 lentelė).

**19 lentelė.** Vidutinis išplautų ir transplantacijai tinkamų embrionų skaičius iš tiriamų ir kontrolinių grupių karvių

| Karvių grupės    | Tiriamosios karvės                          |                                             | Kontrolinės karvės                          |                                             |
|------------------|---------------------------------------------|---------------------------------------------|---------------------------------------------|---------------------------------------------|
|                  | Išplauta embrionų                           | Transplantacijai tinkami embrionai          | Išplauta embrionų                           | Transplantacijai tinkami embrionai          |
|                  | $\bar{x} \pm m_x; \sigma$                   | $\bar{x} \pm m_x; \sigma$                   | $\bar{x} \pm m_x; \sigma$                   | $\bar{x} \pm m_x; \sigma$                   |
| <b>I grupė</b>   | 4,07±0,25 <sup>a</sup><br>0,92              | 2,79±0,32 <sup>e</sup><br>1,19              | 2,67±0,36 <sup>i</sup><br>1,23              | 2,00±0,44 <sup>m</sup><br>1,54              |
| <b>II grupė</b>  | 7,42±0,29 <sup>b</sup><br>1,00              | 4,75±0,68 <sup>f</sup><br>2,34              | 5,23±0,38 <sup>j</sup><br>1,36              | 3,92±0,55 <sup>n</sup><br>1,98              |
| <b>III grupė</b> | 12,0±0,68 <sup>c</sup><br>1,67              | 7,00±0,86 <sup>g</sup><br>2,10              | 9,86±0,34 <sup>k</sup><br>0,90              | 6,29±0,71 <sup>o</sup><br>1,89              |
| <b>Vidut.</b>    | <b>6,81±0,56<sup>d</sup></b><br><b>3,15</b> | <b>4,31±0,42<sup>h</sup></b><br><b>2,40</b> | <b>5,28±0,52<sup>l</sup></b><br><b>2,96</b> | <b>3,72±0,42<sup>p</sup></b><br><b>2,39</b> |

( $p<0,001$ ) – d:h; i:j, i:k, j:k, m:o, a:b, a:c, b:c; ( $p<0,01$ ) – k:o, a:e, b:f, c:g, e:g;

( $p<0,05$ ) – e:p, d:l, m:n, n:o, e:f.

Iš tiriamųjų karvių vidutiniškai 29 % ( $p<0,05$ ) išplauta daugiau embrionų nei iš kontrolinių ir gauta daugiau transplantacijai tinkamų embrionų – 15,9 % ( $p>0,05$ ). Ryškiausias vidutinis išplautų ir transplantacijai tinkamų embrionų skirtumas tarp tiriamų ir kontrolinių karvių grupių nustatytas I karvių grupėje, kurioje iš tiriamųjų karvių išplauta 52,4 % ( $p<0,001$ ) daugiau embrionų ir gauta 39,5 % ( $p>0,05$ ) daugiau transplantacijai tinkamų embrionų nei iš kontrolinių karvių. Mažiausias vidutinis išplautų ir transplantacijai tinkamų embrionų skirtumas nustatytas III karvių grupėje: iš tiriamųjų karvių išplauta vidutiniškai 21,7 % ( $p<0,05$ ) daugiau embrionų ir gauta 11,3 % ( $p>0,05$ ) daugiau transplantacijai tinkamų embrionų nei iš kontrolinių karvių.

Visais atvejais vidutinis išplautų ir transplantacijai tinkamų embrionų skaičius tiriamųjų karvių grupėse yra didesnis nei kontrolinių karvių grupėse.

Tiriamų ir kontrolinių karvių kairės ir dešinės pusės kiaušidžių dydis prieš superovuliaciją stipriai ir statistiškai reikšmingai siejasi su tiriamų karvių išplautų, kontrolinių karvių išplautų ir transplantacijai tinkamų embrionų skaičiumi po superovuliacijos, o su transplantacijai tinkamų embrionų skaičiumi tiriamų karvių statistinis ryšys yra vidutinis, statistiškai reikšmingas. Tiriamų ir kontrolinių karvių kairės ir dešinės pusės kiaušidžių

dydis prieš superovuliaciją atitinkamai 12,7 % ( $p<0,01$ ) kairės ir 10,6 % ( $p<0,01$ ) dešinės kiaušidės stipriau siejasi su kontrolinių karvių transplantacijai tinkamų embrionų skaičiumi nei su tiriamųjų, tačiau skirtumas nedidelis ir statistiškai nereikšmingas (20 lentelė).

**20 lentelė.** Tiriamų ir kontrolinių karvių statistinis ryšys tarp kiaušidžių dydžio prieš/po superovuliacijos ir išplautų/transplantacijai tinkamų embrionų skaičiaus

| Tiriamų/kontrolinių karvių kiaušidės dydis          | Pearson koreliacija | Embrionų skaičius |                          |                    |                          |
|-----------------------------------------------------|---------------------|-------------------|--------------------------|--------------------|--------------------------|
|                                                     |                     | Tiriamųjų karvių  |                          | Kontrolinių karvių |                          |
|                                                     |                     | Išplauti          | Transplantacijai tinkami | Išplauti           | Transplantacijai tinkami |
| Kairės pusės kiaušidės dydis prieš superovuliaciją  | r                   | 0,825*            | 0,622*                   | 0,810*             | 0,701*                   |
| Dešinės pusės kiaušidės dydis prieš superovuliaciją | r                   | 0,861*            | 0,644*                   | 0,871*             | 0,712*                   |
| Kairės pusės kiaušidės dydis po superovuliacijos    | r                   | 0,826*            | 0,661*                   | 0,654*             | 0,580*                   |
| Dešinės pusės kiaušidės dydis po superovuliacijos   | r                   | 0,817*            | 0,513*                   | 0,754*             | 0,618*                   |

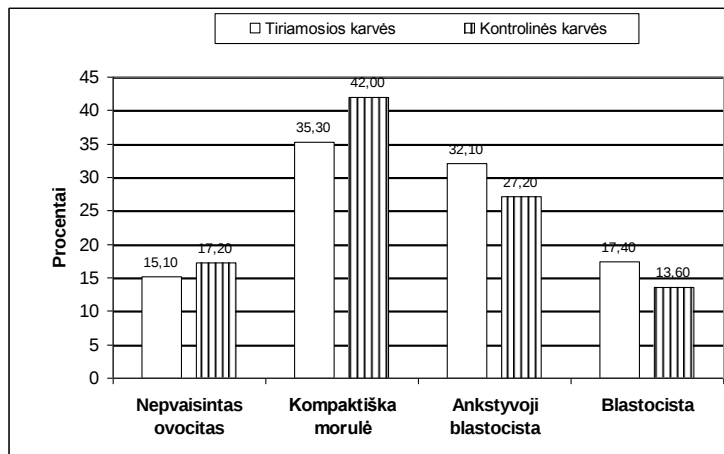
\* – koreliacijos koeficiento reikšmingumas ( $p<0,01$ );

Kairės ir dešinės pusės kiaušidės dydis po superovuliacijos stipriai ir statistikai reikšmingai siejasi su tiriamųjų karvių išplautų embrionų skaičiumi ir vidutiniškai ir statistikai reikšmingai su tiriamų ir kontrolinių karvių transplantacijai tinkamų embrionų skaičiumi. Kairės ir dešinės pusės kiaušidžių dydis po superovuliacijos atitinkamai 26,3 % ( $p<0,01$ ) ir 8,4 % ( $p<0,01$ ) stipriau siejasi su tiriamųjų karvių išplautų embrionų skaičiumi nei su kontrolinių.

### 3.5. Embrionų išsivystymas ir jų kokybė

3.5.1. Tiriamų ir kontrolinių karvių embrionų skaičius pagal išplautų embrionų išsivystymo stadijas

Tiriamųjų ir kontrolinių karvių išplautų embrionų procentinė išraiška pagal embrionų išsivystymo stadijas pateikta 17 pav.



**17 pav.** Tiriamųjų ir kontrolinių karvių išplautų embrionų procentinė išraiška pagal embrionų išsivystymo stadijas

Iš 17 pav. matosi, kad daugiausiai tiriamųjų ir kontrolinių karvių grupėse išplauta kompaktiškos morulės stadijos embrionų, mažiausiai – neapvaisintų ovocitų iš tiriamųjų karvių ir blastocistų – iš kontrolinių. Faktas, kad tiriamųjų karvių grupėse kompaktiškų morulių išplauta mažiau, o ankstyvosios blastocistos ir blastocistos stadijos embrionų daugiau nei kontrolinių karvių grupėse, rodo, kad kiaušidžių stimuliacija ŽILŠ superovuliacijos metu sinchronizuoja (paankstina ir suvienodina) ovocitų subrendimą ir ovuliacijos procesą.

Vidutinis embrionų skaičius pagal išsivystymo stadiją tiriamų ir kontrolinių karvių grupėse 7 parą po sėklinimo pateiktas 21 lentelėje.

**21 lentelė.** Vidutinis embrionų skaičius pagal išsivystymo stadiją tiriamų ir kontrolinių karvių grupėse 7 parą po sėklinimo

| Karvių grupės | Embrionų išsivystymo stadija |                         |                            |                         |                            |                         |                            |                          |
|---------------|------------------------------|-------------------------|----------------------------|-------------------------|----------------------------|-------------------------|----------------------------|--------------------------|
|               | Neapvaisintas ovocitas       |                         | Kompaktiška morulė         |                         | Ankstyvoji blastocista     |                         | Blastocista                |                          |
|               | $\bar{x}; \pm m_x; \sigma$   |                         | $\bar{x}; \pm m_x; \sigma$ |                         | $\bar{x}; \pm m_x; \sigma$ |                         | $\bar{x}; \pm m_x; \sigma$ |                          |
|               | T                            | K                       | T                          | K                       | T                          | K                       | T                          | K                        |
| <b>I</b>      | <b>0,50<sup>a</sup></b>      | <b>0,42<sup>e</sup></b> | <b>1,21<sup>i</sup></b>    | <b>1,50<sup>m</sup></b> | <b>1,57<sup>r</sup></b>    | <b>0,67<sup>u</sup></b> | <b>0,79<sup>a1</sup></b>   | <b>0,08<sup>e1</sup></b> |
|               | $\pm 0,14$                   | $\pm 0,19$              | $\pm 0,19$                 | $\pm 0,29$              | $\pm 0,29$                 | $\pm 0,26$              | $\pm 0,26$                 | $\pm 0,08$               |
|               | 0,52                         | 0,67                    | 0,70                       | 1,00                    | 1,09                       | 0,89                    | 0,97                       | 0,29                     |
| <b>II</b>     | <b>1,08<sup>b</sup></b>      | <b>0,77<sup>f</sup></b> | <b>2,50<sup>j</sup></b>    | <b>2,08<sup>n</sup></b> | <b>2,50<sup>s</sup></b>    | <b>1,54<sup>v</sup></b> | <b>1,33<sup>b1</sup></b>   | <b>0,85<sup>f1</sup></b> |
|               | $\pm 0,19$                   | $\pm 0,26$              | $\pm 0,51$                 | $\pm 0,33$              | $\pm 0,36$                 | $\pm 0,22$              | $\pm 0,40$                 | $\pm 0,41$               |
|               | 0,67                         | 0,93                    | 1,78                       | 1,19                    | 1,24                       | 0,78                    | 1,37                       | 1,46                     |
| <b>III</b>    | <b>2,17<sup>c</sup></b>      | <b>2,00<sup>g</sup></b> | <b>5,00<sup>k</sup></b>    | <b>3,71<sup>o</sup></b> | <b>3,00<sup>s</sup></b>    | <b>2,57<sup>z</sup></b> | <b>1,83<sup>c1</sup></b>   | <b>1,57<sup>g1</sup></b> |
|               | $\pm 0,60$                   | $\pm 0,62$              | $\pm 0,52$                 | $\pm 0,52$              | $\pm 0,63$                 | $\pm 0,48$              | $\pm 0,40$                 | $\pm 0,30$               |
|               | 1,47                         | 1,63                    | 1,26                       | 1,38                    | 1,55                       | 1,27                    | 0,98                       | 0,79                     |
| <b>Vidut.</b> | <b>1,03<sup>d</sup></b>      | <b>0,91<sup>h</sup></b> | <b>2,41<sup>l</sup></b>    | <b>2,22<sup>p</sup></b> | <b>2,19<sup>t</sup></b>    | <b>1,44<sup>ž</sup></b> | <b>1,19<sup>d1</sup></b>   | <b>0,72<sup>h1</sup></b> |
|               | $\pm 0,18$                   | $\pm 0,21$              | $\pm 0,33$                 | $\pm 0,25$              | $\pm 0,24$                 | $\pm 0,21$              | $\pm 0,21$                 | $\pm 0,20$               |
|               | 1,00                         | 1,17                    | 1,88                       | 1,41                    | 1,33                       | 1,16                    | 1,18                       | 1,14                     |

(**p<0,001**) – p:h1, d:l, d:t, h:p, i:k; (**p<0,01**) – e:d1, j:k, m:o, u:z, lt, t:d1, e1:g1;

(**p<0,05**) – ž:h1, t:ž, r:u, a1:e1, s:v, a:b, a:c, i:j, a1:c1, e:g, n:o, p:ž, u:v

T – tiriamosios karvės; K – kontrolinės karvės

Vidutinis neapvaisintų ovocitų skaičius tiriamųjų karvių grupėse buvo 13,2 % ( $p>0,05$ ) didesnis nei kontrolinių karvių (21 lentelė). Tačiau neapvaisintų ovocitų tiriamųjų karvių grupėse išplauta 2,02 % ( $p>0,05$ ) mažiau nei kontrolinių karvių grupėse.

Vidutinis kompaktiškos morulės stadijos embrionų skaičius tiriamųjų karvių grupėse buvo vidutiniškai 8,6 % ( $p>0,05$ ) didesnis nei kontrolinių karvių. Šios išsivystymo stadijos embrionų tiriamųjų karvių grupėse išplauta 6,69 % ( $p>0,05$ ) mažiau nei iš kontrolinių karvių.

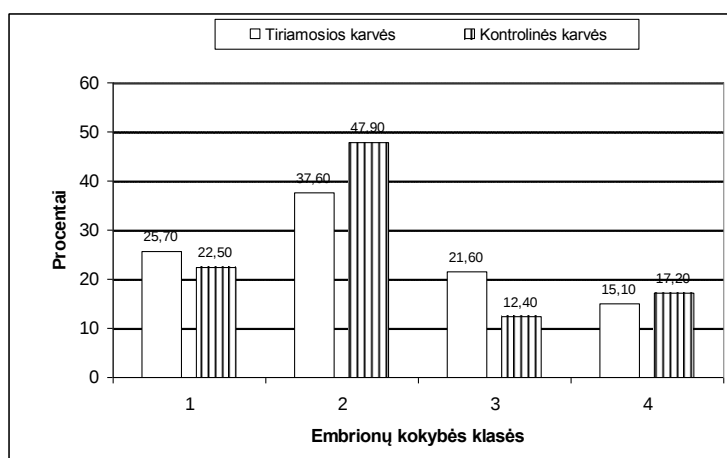
Tiriamų karvių grupėse ankstyvosios blastocistos stadijos embrionų vidutinis skaičius buvo 52,1 % ( $p<0,05$ ), o blastocistos stadijos – 65,3 % ( $p>0,05$ ) didesnis už šių stadijų embrionų vidurkius kontrolinių karvių grupėse. Ankstyvosios blastocistos ir blastocistos stadijos embrionų išplauta atitinkamai 4,89 % ( $p<0,05$ ) ir 3,82 % ( $p>0,05$ ) daugiau nei kontrolinių karvių grupėse. Analizuojant karvių grupių įvairių stadijų embrionų vidurkius, ryškiausias stimuliacijos ŽILŠ efektas matomas lyginant tiriamųjų ir kontrolinių I grupės karvių ankstyvosios blastocistos ir blastocistos stadijų embrionų skaičių. Vidutinis ankstyvosios blastocistos stadijos embrionų skaičius I tiriamųjų karvių grupėje buvo 134,3 % ( $p<0,05$ ) didesnis nei analogiškoje kontrolinių karvių grupėje. I tiriamųjų

karvių grupėje išplauta 11 blastocistos stadijos embrionų, o I kontrolinių karvių grupėje – 1, todėl šios stadijos embrionų vidurkių palyginimas statistikai nepatikimas. II tiriamųjų karvių grupėje ankstyvosios blastocistos stadijos vidutinis embrionų skaičius buvo 62,3 % ( $p < 0,05$ ) didesnis, o blastocistos stadijos – 56,5 % ( $p > 0,05$ ) didesnis už vidutinį atitinkamų stadijų embrionų skaičių II kontrolinėje karvių grupėje.

III tiriamųjų karvių grupėje abiejų blastocistų stadijų embrionų išplauta vidutiniškai 17 % ( $p > 0,05$ ) daugiau nei III kontrolinių karvių grupėje.

### 3.5.2. Tiriamų ir kontrolinių karvių embrionų skaičius pagal išplautų embrionų kokybės klases

Tiriamųjų ir kontrolinių karvių išplautų embrionų procentinė išraiška pagal embrionų kokybės klases pateikta 18 pav.



**18 pav.** Tiriamųjų ir kontrolinių karvių išplautų embrionų procentinė išraiška pagal embrionų kokybės klases

Tiriamųjų ir kontrolinių karvių grupėse daugiausia išplauta 2 (patenkinamos) kokybės klasės embrionų (18 pav.). Teigiamas ŽILŠ stimuliacijos efektas matomas lyginant iš tiriamų ir kontrolinių karvių išplautų aukščiausios kokybės (1 klasė) ir prasčiausios 4 kokybės klasės (neapvaisintų ar degeneravusių ovocitų) embrionų skaičių.

**22 lentelė.** Vidutinis embrionų skaičius pagal kokybės klases tiriamų ir kontrolinių karvių grupėse

| Karvių grupės | Embriونų kokybės klasės      |                         |                              |                         |                              |                         |                                     |                         |
|---------------|------------------------------|-------------------------|------------------------------|-------------------------|------------------------------|-------------------------|-------------------------------------|-------------------------|
|               | 1 klasė<br>(puikūs)          |                         | 2 klasė<br>(patenkinami)     |                         | 3 klasė<br>(prasti)          |                         | 4 klasė<br>(negyvi, ar degeneruoti) |                         |
|               | $\bar{x} \pm m_{x_i} \sigma$ |                         | $\bar{x} \pm m_{x_i} \sigma$ |                         | $\bar{x} \pm m_{x_i} \sigma$ |                         | $\bar{x} \pm m_{x_i} \sigma$        |                         |
|               | T                            | K                       | T                            | K                       | T                            | K                       | T                                   | K                       |
| <b>I</b>      | <b>1,29<sup>a</sup></b>      | <b>0,50<sup>d</sup></b> | <b>1,50<sup>g</sup></b>      | <b>1,50<sup>i</sup></b> | <b>0,79</b>                  | <b>0,25</b>             | <b>0,50<sup>n</sup></b>             | <b>0,42<sup>r</sup></b> |
|               | $\pm 0,30$                   | $\pm 0,23$              | $\pm 0,20$                   | $\pm 0,31$              | $\pm 0,26$                   | $\pm 0,13$              | $\pm 0,14$                          | $\pm 0,19$              |
|               | 1,14                         | 0,80                    | 0,76                         | 1,09                    | 0,97                         | 0,45                    | 0,52                                | 0,67                    |
| <b>II</b>     | <b>2,08<sup>b</sup></b>      | <b>1,08<sup>e</sup></b> | <b>2,67</b>                  | <b>2,85<sup>j</sup></b> | <b>1,58</b>                  | <b>0,54</b>             | <b>1,08<sup>o</sup></b>             | <b>0,77</b>             |
|               | $\pm 0,34$                   | $\pm 0,26$              | $\pm 0,48$                   | $\pm 0,41$              | $\pm 0,48$                   | $\pm 0,27$              | $\pm 0,19$                          | $\pm 0,26$              |
|               | 1,16                         | 0,95                    | 1,67                         | 1,46                    | 1,68                         | 0,97                    | 0,67                                | 0,93                    |
| <b>III</b>    | <b>2,50<sup>c</sup></b>      | <b>2,57<sup>f</sup></b> | <b>4,50<sup>h</sup></b>      | <b>3,71<sup>k</sup></b> | <b>2,83</b>                  | <b>1,57</b>             | <b>2,17<sup>p</sup></b>             | <b>2,00<sup>s</sup></b> |
|               | $\pm 0,22$                   | $\pm 0,57$              | $\pm 0,89$                   | $\pm 0,29$              | $\pm 1,08$                   | $\pm 0,57$              | $\pm 0,60$                          | $\pm 0,62$              |
|               | 0,55                         | 1,51                    | 2,17                         | 0,76                    | 2,64                         | 1,51                    | 1,47                                | 1,63                    |
| <b>Vidut.</b> | <b>1,81<sup>s</sup></b>      | <b>1,19<sup>t</sup></b> | <b>2,50</b>                  | <b>2,53</b>             | <b>1,47<sup>l</sup></b>      | <b>0,66<sup>m</sup></b> | <b>1,03</b>                         | <b>0,91</b>             |
|               | $\pm 0,20$                   | $\pm 0,23$              | $\pm 0,32$                   | $\pm 0,26$              | $\pm 0,31$                   | $\pm 0,19$              | $\pm 0,18$                          | $\pm 0,21$              |
|               | 1,15                         | 1,28                    | 1,80                         | 1,46                    | 1,76                         | 1,07                    | 1,00                                | 1,17                    |

(**p<0,001**) – a:c; (**p<0,01**) – d:f; (**p<0,05**) – l:m, b:e, r:s, i:j, i:k, e:f, n:o, n:p, g:h, a:b; š:t

T – tiriamosios karvės; K – kontrolinės karvės

Vidutinis 2 kokybės klasės išplautų embrionų skaičius tiriamųjų ir kontrolinių karvių grupėse buvo beveik vienodas (tiriamųjų karvių 1,2 % didesnis ( $p>0,05$ )), tačiau šios kokybės klasės embrionų tiriamųjų karvių grupėse išplauta 11,23 % ( $p>0,05$ ) mažiau nei iš kontrolinių.

Vidutinis 3 kokybės klasės (prastų) embrionų skaičius tiriamųjų karvių grupėse buvo 122,7 % ( $p<0,05$ ) didesnis nei kontrolinių karvių. Šios kokybės klasės embrionų tiriamųjų karvių grupėse išplauta 9,13 % ( $p<0,05$ ) daugiau nei iš kontrolinių karvių.

Negyvų ovocitų ar degeneruotų embrionų (4 kokybės klasės) vidutinis skaičius tiriamųjų karvių grupėse buvo 13,2 % ( $p>0,05$ ) didesnis nei kontrolinių karvių. Tačiau šios kokybės klasės embrionų tiriamųjų karvių grupėse išplauta 2,02 % ( $p>0,05$ ) mažiau nei iš kontrolinių karvių.

Ryškus stimuliacijos ŽILŠ efektas matomas lyginant tiriamųjų ir kontrolinių grupių karvių 1 kokybės klasės vidutinį embrionų skaičių. I ir II tiriamųjų karvių grupėse 1 kokybės klasės embrionų buvo atitinkamai 158,0 % ( $p>0,05$ ) ir 92,6 % ( $p<0,05$ ) daugiau nei analogiškose kontrolinių karvių grupėse.

Transplantacijai tinkamų (1 ir 2 kokybės klasės) embrionų skaičius tiriamų ir kontrolinių karvių grupėse nurodytas 23 lentelėje.

**23 lentelė.** *Transplantacijai tinkamų embrionų skaičius tiriamų ir kontrolinių karvių grupėse*

| Karvių grupės   | Embrionų kokybės klasės |                       |                              |                       |
|-----------------|-------------------------|-----------------------|------------------------------|-----------------------|
|                 | 1 klasė (puikūs)<br>(n) |                       | 2 klasė (patenkinami)<br>(n) |                       |
|                 | Tiriamosios<br>karvės   | Kontrolinės<br>karvės | Tiriamosios<br>karvės        | Kontrolinės<br>karvės |
| <b>I</b>        | 18                      | 6                     | 21                           | 18                    |
| <b>II</b>       | 25                      | 14                    | 32                           | 37                    |
| <b>III</b>      | 15                      | 18                    | 27                           | 26                    |
| <b>Iš viso:</b> | <b>58</b>               | <b>38</b>             | <b>80</b>                    | <b>81</b>             |

Tiriamųjų ir kontrolinių karvių grupėse didesnę transplantacijai tinkamų embrionų dalį sudarė 2 kokybės klasės embrionai, atitinkamai 58,0 % ( $p < 0,01$ ) tiriamųjų ir 68,1% ( $p < 0,05$ ) kontrolinių karvių. Transplantacijai tinkamų 1 kokybės klasės embrionų iš tiriamųjų karvių išplauta 52,63% ( $p > 0,05$ ) daugiau nei iš kontrolinių, o 2 kokybės klasės tiriamųjų ir kontrolinių karvių embrionų kiekis beveik vienodas, skirtumas statistiškai nepatikimas.

#### 4. REZULTATŲ APTARIMAS

Sveikatingumo atžvilgiu karvėms sunkiausias metas yra periodas po veršiavimosi (*pp – post partum*). Veršiavimasis – tai sudėtingas karvės fiziologinis procesas, kai intensyviai persitvarko neuroendokrininė sistema, keičiasi medžiagų apykaita, pakinta lytinių organų fiziologija. Veršiavimasis susieja laikotarpį prieš atvedimą su periodu po apsiveršiavimo, kurio metu sparčiai didėja karvių pieningumas. Šis periodas trunka iki 60–70 laktacijos paros, kol karvė pasiekia savo produkinių galimybių fiziologinį maksimumą. Šiuo tarpsniu lengviausiai yra pažeidžiamos karvės organizmo reguliacijos ir atsparumo sistemos, todėl dažnai po atvedimo karvės suserga medžiagų apykaitos ligomis, pieno liaukos ar gimdos uždegimu – metritu. Karvėms gimdos infekcijos yra vienas svarbiausių sutrikimų po veršiavimosi (Azawi, 2008). Didelis karvių sergamumas metritu yra aktuali problema daugelyje pasaulio šalių. Po apsiveršiavimo šis susirgimas pasireiškia 25–83,3 % karvių. Lietuvos ūkiuose metritais serga 11 %, o kai kuriose stambiose fermose – net 33,2–48,6 % karvių (Špakauskas ir kt., 2005). Gimdos uždegimą sukeliantys patogeniniai mikroorganizmai gamindami toksinus pažeidžia gimdos gleivinę ir sukelia uždegimą. Ar karvė susirgs gimdos uždegimu priklauso nuo jos organizmo imuninio atsako į patekusius mikroorganizmus, mikroorganizmų rūšies ir jų kiekio. Vykstant normaliam procesui po apsiveršiavimo, gimda, išskirdama lochijas, pati išsivalo nuo mikroorganizmų ir uždegimas nesukeliamas (Azawi et al., 2007).

Metritų etiologijoje svarbiausi faktoriai yra mikroorganizmai, nespecifinė mikroflora, kuri į gimdą patenka per pirmąją savaitę po apsiveršiavimo (BonDurant, 1999). Ji yra labai įvairi: *Actinomyces pyogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus spp.*, *Streptococcus spp.* ir *Pasteurella spp.* (Noakes et al., 1991; Sheldon, Dobson, 2004). Pagal Petit ir kolegas (2009), apsiveršiusioms karvėms metritą dažniausiai sukelia *Escherichia coli*, *Staphylococcus spp.*, ir *Streptococcus spp.* Williams ir kolegų (2005) duomenimis, labiausiai paplitę metrito sukėlėjai yra *E. coli* (37 %) ir *A. pyogenes* (49 %). Be to, išsivysčiusi *E. coli* infekcija sudaro tinkamas sąlygas *A. pyogenes* infekcijos atsiradimui (Williams et al., 2007). Lietuvoje atliktų tyrimų duomenimis, vienas iš reikšmingiausių metritų sukėlėjų yra auksinis stafilokokas (*S. aureus*) (Masiulis ir kt., 2003). Vykstant fiziologinei involiucijai, infekciją organizmas eliminuoja ir praėjus 45 paroms po apsiveršiavimo gimdos turinio mėginiuose dažniausiai mikroorganizmų nenustatoma (Dohmen et al., 1995). Ypač atspari

antimikrobinėms medžiagoms infekcija nustatoma vėliau nei 21 parą po apsiveršavimo, paprastai siejama su *Actinomyces pyogenes*, *Bacterioides spp.* Šios infekcijos gali slopinti neutrofilų fagocitinį aktyvumą, todėl endometritas įgauna persistuojančią formą (Anderson et al., 1996).

Pagal Sheldon ir bendraautorius (2008), pogimdyminai metritai po atsivedimo pasireiškia iki 21 dienos po apsiveršavimo. Karvių gimda būna be tonuso, drebli, labai padidėjusi, išskyros iš gimdos vandeningos, raudonai rudos spalvos, nustatoma didesnė nei 39,5°C temperatūra, karvės apatiškos, galimi toksemijos požymiai, mažėja primelžiamo pieno kiekis. Karvės, kurios neturi sisteminio susirgimo požymių, tačiau jei jų gimda yra be tonuso, drebli ir labai padidėjusi, o iš makšties teka pūlingos gimdos išskyros iki 21 dienos po apsiveršavimo, gali būti laikomos kaip sergančios klinikiniu metritu. Klinikiniam endometritui yra būdingos pūlingos gimdos išskyros:

- $\geq 21$  d. po apsiveršavimo – daugiau kaip 50 % išskyrų sudaro pūliai;
- $\geq 26$  d. po apsiveršavimo – išskyras sudaro: 50 % pūliai ir 50 % gleivės (Sheldon et al., 2008).

Septinį metritą sukelia *Corynebacter pyogenes*, *Hemolytic staphylococci*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Hemolytic streptococci*, o retais atvejais – klostridijos. Dažniausiai metritą sukelia nespecifinė mikloflora, tokia kaip *Trueperella pyogenes* ir *Escherichia coli* (Lewis, 2003).

Involiucijos metu ir esant uždegimui gimdos turinyje ypač pagausėja makrofagų (Žilaitis ir kt., 2004). Gimdos infekcijos ilgina periodo po apsiveršavimo trukmę ir dažniausiai tampa endometritu ir nevaisingumo priežastimi. Manoma, kad tikslinga taikyti antibiotikų terapiją karvėms, kurioms po atvedimo diagnozuotas nuovalų užsilaikymas (Cairolis et al., 1993).

Metritas taip pat yra susijęs su makšties, išorinių lytinių organų ir gimdos vėlesniu atsistatymu. Nustatyta, kad ankstyvame *pp* laikotarpyje aukštesnė nei +39°C kūno temperatūra yra gimdos uždegimo požymis (Palenik et al., 2009). Todėl gamybinėje praktikoje karvėms, kurių temperatūra aukštesnė nei +38,9°C, yra skiriama antibiotikų terapija, kaip metritų profilaktikos priemonė ankstyvajame periode po atvedimo. Kristula su kolegomis (2001) teigia, kad sveikų karvių ankstyvajame *pp* laikotarpyje temperatūra 10 parų nepadidėja daugiau nei +38,9°C. Padidėjusi rektinė temperatūra esant metritui dažniausiai yra nustatoma 3–6 parą *pp* (Benzaquen et al., 2007).

Nors randama mikroflora yra pagrindinis gimdos uždegimo etiologinis faktorius, tačiau metritų etiologijoje itin svarbus yra neigiamas energijos balansas (Ciciolis et al., 2003). Po apsiveršavimo sparčiai didėjant pieno kiekiui daugelis aukštos produkcijos karvių pereinamuoju laikotarpiu patiria energijos trūkumą, lemiantį prastėjančius karvių reprodukcijos rodiklius

(Carvalho et al., 2014). Galima teigti, kad energijos deficitas ankstyvuoju *pp* periodu yra viena iš gimdos uždegimų priežasčių, todėl labai svarbu šiuo laikotarpiu laiku diagnozuoti susirgimus ir efektyviai juos išgydyti.

Gydant metritus, pasaulyje yra plačiai naudojamos antimikrobinės medžiagos ir tai yra labai svarbi efektyvaus gydymo dalis (Foldi et al., 2009). Reikia atkreipti dėmesį į tai, kad gydymas turi būti efektyvus ir ne per daug brangus. Preparatai neturi slopinti natūralių gimdos imuninių-gynybinių mechanizmų, traumuoti endometriumo. Antimikrobiniai preparatai neturėtų visiškai sunaikinti bakterijų gimdoje, jie turėtų tik sumažinti jų kiekį iki tokio lygio, kad karvės gimdos apsaugos barjerai galėtų patys sunaikinti patogenines bakterijas ir kad karvė įgytų imunitetą (LeBlanc, 2008). Tačiau daugeliu atvejų neadekvatus antimikrobinių preparatų naudojimas ir dozavimas sudaro sąlygas mutuoti mikroorganizmams. Netinkamai gydomi ūmūs metritai gali pereiti į lėtinę formą (Masiulis ir kt., 2003; Kaczmarowski et al., 2004). Gimdos uždegimu sergančioms karvėms neatlikus lochijų mikrobiologinio tyrimo ir nenustačius sukėlėjų jautrumo antibiotikams, naudojami preparatai nebus veiksmingi ir efektyvūs, bakterijos prisitaikys ir išsivystys jų atsparumas antibiotikams.

Antimikrobinių medžiagų panaudojimas karvių metritų gydymui turėtų būti ribojamas dar ir todėl, kad involiucijos procesas yra septinis, o vykstant fiziologiniam gimdos atsistatymo procesui gimdos gleivėse natūraliai mažėja mikroorganizmų rūšių, yra aktyvinamos apsauginės organizmo imuninės sistemos (Kuntze, Aurich, 1995). Kai kuriais duomenimis, nespecifinė mikroflora gimdoje yra teigiama aplinkybė, nes suaktyvina ląstelinį imunitetą – neutrofilų migraciją į gimdos ertmę (Hussain et al., 1990).

Net ir laiku pasišalinus nuovaloms, metritais suserga 31,8 % karvių, o nuovaloms užsilaikius – 82,5 %, po normalaus apsiveršiavimo metritais dažniausiai suserga 10–15 parą *pp* (Barlund et al., 2008). Ištirta, kad po apsiveršiavimo sveikų ir sergančių karvių gimdoje yra nustatomos tos pačios mikroorganizmų rūšys (Kaczmarowski et al., 2004). Todėl yra daroma prielaida, kad *pp* periodu, sumažėjus organizmo rezistentiškumui ir nusilpus gimdos tonusui, susidaro palankios sąlygos mikrofloros dauginimuisi ir sąlyginai patogeniniai mikrobai tampa patogeniniais. Tuo paaiškinami karvių metritai, diagnozuojami net ir tuo atveju, jei veršiavimasis buvo normalus. Yra nustatyta, kad pirmaveršės karves perkėlus į tvartą, kuriame anksčiau masiškai pasireikšdavo karvių metritai, pastarosios taip pat susirgo. Metritai yra dažnesni tose fermose, kuriose karvėms nėra taikomas aktyvus mocionas. Gydant antimikrobiniais preparatais randama ir dar keletas kitų trūkumų.

Neracionaliai juos naudojant išsivysto antibiotikams atsparūs mikroorganizmai ir darosi sunkiau išgydyti infekcinius gyvulių susirgimus. Vis dažniau skelbiami duomenys apie bakterijų atsparumą penicilinams, tetraciklinams, aminoglikozidams ir kitų grupių antibiotikams (Špakauskas, ir kt., 2005). Viena iš svarbiausių priežasčių, skatinančių ieškoti naujų gydymo būdų ir atsisakyti antibiotikų bei hormonų naudojimo, yra ta, kad šios medžiagos išsiskiria iš organizmo su pienu ir mėsa.

Pieno supirkėjai nesuperka pieno ir mėsos, jei randama antibiotikų ar kitų inhibitorinių medžiagų ne tik dėl jų žalos žmogaus sveikatai, bet ir dėl to, kad toks pienas yra netinkamas pramoniniam perdirbimui. Dėl didėjančių apribojimų naudoti antibiotikus ir hormoninius preparatus maistui auginamiems gyvuliams (Drillich et al., 2005) yra ieškoma naujų, inovatyvių ir netradicinių terapijos metodų (Arlt, 2006).

Perspektyviausias gimdos susirgimų prevencijos metodas – imuninės sistemos stiprinimas. Uždegimo pradžioje vyrauja nespecifinės organizmo reakcijos, o vėliau yra inicijuojami specifiniai imuniniai mechanizmai. Pirminė reakcija į infekciją – neutrofilų antplūdis, kuris mažina uždegimą (Galvao et al., 2011). Neutrofilai prasiskverbia į tuščias audinio vietas ir naikina mikroorganizmus. Kai jie patenka į gimdos ertmę, įvyksta mikroorganizmų, toksinų ir lizuotų audinių opsonizacija, sustiprinama fagocitozė. Cirkuliuojantys neutrofilai sugeba fagocituoti ir nužudyti bakterijas, gamindami superoksido anijonus. Tačiau gramneigiamos bakterijos dėl jose esančių lipopolisacharidų geba silpninti neutrofilų aktyvumą, todėl kai kurios karvės endometritu serga itin ilgai.

Metritų gydymo taktikoje ypatingos reikšmės turi prostaglandinai ir estrogenai.  $\text{PGF}_{2\alpha}$  yra naudojamas gydymui tais atvejais, kai karvė serga metritu ir yra užsilaikęs geltonkūnis. Geriausi rezultatai gaunami prostaglandinus derinant su antibiotikais. Nustatyta, kad 5–10 mg estradiolio dozės buvo tokios pat efektyvios, kaip ir  $\text{PGF}_{2\alpha}$ . Vis dėlto laikotarpis nuo gydymo pradžios iki apvaisinimo gydant estradioliu yra ilgesnis, nei gydant  $\text{PGF}_{2\alpha}$  kartu su antibiotikais, leidžiamais į gimdą. Praktikoje dažnai yra taikomi jodo preparatai, kurie gerina kraujotaką, mažindami kraujo klampumą ir kraujagyslių tonusą, gerai rezorbuojasi, halogenina ir oksiduoja mikroorganizmų gyvybei svarbias struktūras, todėl sukelia baktericidinį, sporocidinį, protozoocidinį ir virusocidinį poveikį. Jodas veikia baktericidiškai gramteigiamas ir gramneigiamas bakterijas ir patogeninius grybelius.

Dėl gimdos uždegimų polietiologinės kilmės, gydomų karvių pieno panaudojimo apribojimų, šios ligos gydymas yra vertinamas prieštaringai (Drillich et al., 2001; LeBlanc et al., 2002). Ilgą laiką taikyta perspektyvi terapijos kryptis – homeopatija – gimdos uždegimų gydyme pasirodė

neefektyvi (Arlt et al., 2009). Todėl vienas iš perspektyvių gimdos uždegimo profilaktikos ir gydymo būdų gali būti fizioterapija ŽILŠ.

Pastaraisiais metais pasaulyje plintant ekologiskumo idėjai ieškoma naujų, efektyvesnių ir ekologiškų terapijos metodų, todėl vis plačiau kalbama apie šviesos terapiją. Gydymas lazeriu grindžiamas skirtingo intensyvumo šviesos sąveika su bioobjektais, panaudojant dviejų tipų lazerius: aukšto ir žemo intensyvumo (Calin, Coman, 2011). Lazerio generuojama energija įsiskverbia į audinį skirtingu gyliu, priklausomai nuo bangos ilgio. Šviesos terapijos gydymasis poveikis pasiekiamas dienos šviesa arba specialaus bangos ilgio, poliarizacijos ar spektro šviesa. Daugelyje bandymų su gyvūnais naudojami ultravioletiniai, mažiau tyrimų atliekama su infraraudonaisiais lazeriais. Pastebėta, kad gyvūnų audiniai geba praleisti tam tikro ilgio bangos šviesą. Šviesos absorbcija ir skverbtiis priklauso nuo audinio cheminės sudėties. Atsimenant, kad ląstelė ar audinys yra sinergetiška sistema, t. y. gali keistis, jei veikia išorinė energija, lazerio spindulių taikymas siekiant teigiamai paveikti biologinę sistemą yra pakankamai pagrįstas. Lazerio spinduliuotė nuo paprastos šviesos pirmiausia skiriasi tuo, jog yra koherentinė, kitaip sakant, jos skėstis yra nedidelė ir šviesa sklinda siauru spinduliu, todėl yra lengviau sufokusuojama. Kitas lazerių privalumas, jog jų imituojama šviesa yra vienspalvė. Dar viena labai svarbi savybė – lazerinė spinduliuotė gali būti itin didelių galių.

Paprastai naudojami lazeriai, šviesos diodai, fluorescencinės dichroinės lempos (skaidančios monochromatinę šviesą į sudedančias spektro dalis). Šviesos terapijoje yra derinamas biologinis makroorganizmo ritmas ir terapijos trukmė, šviesos bangos ilgis, dažnis, fazė ir intensyvumas. Šviesa gydomas platus spektras susirgimų: dienos šviesa – nervų sistemos sutrikimai, fluorescencinėmis lempomis – odos ligos, stabdomas mikroorganizmų vystymasis. Bakteriocidinis trumpų, artimų violetiniam spektrui, bangų poveikis siejasi su deguonies aktyvių formų susidarymu mikroorganizmo aplinkoje ir šviesai jautrių struktūrų (turinčių porfirinių žiedų) aktyvavimu pačiame mikroorganizme. Matomojo spektro trumpos bangos sensibilizuoja mikroorganizmus ir jie tampa jautresni ultratrumpų šviesos bangų poveikiui. Ilgos matomo spektro bangos pasižymi fotobiomoduliaciniu veikimu – stimuliuoja ląsteles, padidindamos ATP koncentraciją. Fotomoduliaciniu veikimu pasižyminčios šviesos bangos taikomos onkologinių ligų gydyme, nes geba skatinti apoptozę. Kai kurių šviesos šaltinių poveikis iki galo neatskleistas. Pavyzdžiui, pastebėta, kad šviesos diodų generuojama šviesa teigiamai veikia kai kurių gyvūnų lytines ląsteles. Poliarizuota šviesa (bangos amplitudė orientuota erdvėje) didina

eritrocitų membranų receptorių aktyvumą ir citokininų koncentraciją, bei mažina lipidų kiekį kraujyje (Ilic-Stojanovic et al., 2008).

Pagal spinduliavimo intensyvumą lazerius galima suskirstyti į žemo ir aukšto intensyvumo. Medicininėje praktikoje taikomos abi lazerio rūšys. Tačiau kaip fotomoduliacinė priemonė vis plačiau naudojami žemo intensyvumo arba šaltieji lazeriai. Tai prietaisai, generuojantys nedidelio intensyvumo koherentinę (vienos bangos ilgio, dažnio ir fazės) šviesą. Taip vadinamas žemo intensyvumo lazeris yra taikomas chirurgijoje, dermatologijoje, ortopedijoje. Šviesos bangos priklausomai nuo bangos ilgio gali įsiskverbti į audinį. Pavyzdžiui 660 nm bangos įsiskverbia apie 8–10 mm, o infraraudonosios – 30–40 mm. Šviesos absorbcija ir skverbtiis priklauso nuo audinio cheminės sudėties. Oda ir jos dariniai gerai sugeria raudono spektro bangas, o kalcio ir fosforo turintys dariniai – praktiškai bet kokio ilgio bangas. 780–830 nm infraraudonosios bangos taikomos sausgyslių ir jų makščių patologijoms gydyti, skausmui mažinti, padeda rezorbuotis hematoma, naudojamos kaip priemonė giliajai akupunktūrai. 630–700 nm bangos stimuliuoja žaizdų regeneraciją, gali būti taikomos kaip paviršiaus akupunktūros priemonė.

Lazerio šviesa gali būti suardomos sensibilizuotų šviesai jaunų ląstelių struktūros. Šiuo principu paremta neoplastinių susirgimų diagnostika ir gydymas. Praktikoje lazerio terapija naudojama uždegimo slopinimui (Huang et al., 2009). Pastebėtas teigiamas poveikis ląstelių regeneracijai (Shanyfelt et al., 2008). Lazerio terapijos profilaktinis panaudojimas metritų profilaktikoje siejasi su Zhevago ir kolegų (2006) pastebėjimais, kad šviesa turi reguliuojamąjį poveikį ląsteliniam imunitetui.

Mūsų tyrimų rezultatai patvirtina aukščiau aprašytų autorių pastebėjimus dėl teigiamo ŽILŠ efekto stiprinant imuninę sistemą. Manome, kad būtent dėl šio poveikio stimuliuotų ŽILŠ ir gydytų antibiotikais bei stimuliuotų ŽILŠ karvių grupėse, lyginant su kontrolinėmis, buvo nustatyta atitinkamai 21,1 % ( $p < 0,05$ ) ir 27,5 % ( $p < 0,05$ ) mažiau karvių *pp* periodu susirgusių reprodukcinės organų ir virškinimo trakto ligomis.

Ankstesniais tyrimais buvo nustatyta, kad lazerio spinduliai pasižymi baktericidiniu veikimu (Žilaitis et al., 2006), tačiau mums nepavyko to įrodyti. Tyrimo metu gimdos ir kiaušidžių stimuliacija ŽILŠ *in vivo* neturėjo ryškaus terapinio efekto, nes stimuliacijos ŽILŠ įtakoje karvės, sirgusios metritais pasveiko tik 0,6 paros (3 %,  $p > 0,05$ ) greičiau nei intaktinių karvių grupėje. Tačiau mūsų tyrimo metu buvo nustatytas sinerginis stimuliacijos ŽILŠ ir antibiotikų terapijos poveikis: dėl profilaktikos antibiotikais ir stimuliacijos ŽILŠ poveikio karvės, sirgusios metritais, pasveiko 1,7 paros (13,8 %,  $p < 0,05$ ) greičiau nei gydant vien tik antibiotikais.

Vertinant stimuliacijos ŽILŠ poveikį pagal karvių reprodukcijos rodiklius pastebėta, kad karvės, profilaktiškai stimuliuotos ŽILŠ ar stimuliuotos ŽILŠ derinyje su antibiotikais, apsivaisino ženkliai greičiau, nei gydytos antibiotikais ar negydytos. Ryškiausias teigiamas stimuliacijos ŽILŠ poveikis nustatytas palyginus tiriamųjų ir kontrolinių karvių veršiavimosi–apsivaisinimo periodo trukmę. Šis rodmuo yra objektyvus karvių reprodukcinės funkcijos būklės nustatymo rodiklis (Kuhn et al., 2004), todėl gali būti vertinamas kaip vienas iš pagrindinių rodiklių nustatant stimuliacijos ŽILŠ efektą karvių reprodukinei funkcijai.

Tyrimo rezultatai atskleidė, kad veršiavimosi–apsivaisinimo periodas gydytų antibiotikais ir stimuliuotų ŽILŠ karvių grupėje buvo 31,4 paros (34,17 %, ( $p < 0,05$ )) trumpesnis nei vien tik antibiotikais gydytų karvių ir 31,6 paros (34,39 %, ( $p < 0,05$ )) trumpesnis nei profilaktiškai negydytų karvių grupėje.

Dėl stimuliacijos ŽILŠ poveikio statistiškai patikimai sutrumpėjo laikotarpis nuo apsiveršiavimo iki pirmo sėklinimo (pirmojo sėklinimo laikas), kuris antibiotikais gydytų ir stimuliuotų ŽILŠ karvių buvo vid. 17 parų (36,9 % ( $p < 0,05$ )) trumpesnis lyginant su vien tik antibiotikais gydytų karvių grupe.

Remiantis šiais rezultatais galima daryti išvadą, kad profilaktinė karvių stimuliacija ŽILŠ ankstyvuoju *pp* periodu turėjo teigiamos įtakos greitesniam kiaušidžių funkcijos atsistatymui ir visavertiškam ovocitų subrendimui. Manome, kad teigiamas ŽILŠ poveikis ankstyvuoju *pp* periodu gali būti siejamas su aktyvesniu citokinų priešuždegiminiu poveikiu (pagreitėja granulocitų ir monocitų stimuliacija) (Zhevago, Samoilova, 2006) ir su imuninės sistemos stimuliacija *in vivo* (Novoselova et al., 2006). Be to, stimuliacija ŽILŠ suaktyvina ląstelių poliferaciją (Shanyfelt et al., 2008), todėl yra skatinamas ir optimizuojamas ovocitų augimas ir visavertiškas jų subrendimas. Vadinasi, stimuliacija ŽILŠ gali būti naudojama kaip efektyvi fizioterapijos priemonė optimizuoti periodo po atvedimo komplikacijų gydymą.

Pastebėta, kad grupėje karvių, apdorotų lazeriu ir antibiotikais, buvo daugiausia tokių, kurių veršiavimosi–apsivaisinimo periodas svyravo tarp 80 ir 100 parų. Šioje grupėje nenustatyta karvių, kurių servis periodas būtų ilgesnis kaip 160 parų. Tuo tarpu neapdorotų lazeriu pavienių karvių servis periodas siekė iki 300 parų. Tai pagrindžia stimuliacijos ŽILŠ universalumą, todėl galime teigti, kad ši fizioterapijos priemonė yra tinkama įvairaus produktyvumo ir amžiaus karvių metritų ir kitų reprodukcinų susirgimų profilaktikai.

Siekiant pagerinti gyvūnų genetinį potencialą bei išsaugoti gyvūnų genetinius išteklius, mokslininkai sukūrė metodą greitam išskirtinių

genotipų gyvūnų padauginimui – embrionų transplantaciją. Tai naujas produktyviausių veislinių galvijų veisimo modelis, kuris labai greitai išpopuliarėjo visame pasaulyje ir sėkmingai buvo pradėtas naudoti pieninėje galvijininkystėje. Galimybė iš produktyvios karvės per metus gauti daugiau kaip vieną palikuonį paskatino šį metodą pradėti plačiai naudoti komerciniams tikslams.

Embrionų transplantacijos kertinis momentas – superovuliacijos efektyvumas. Šiuo metu superovuliacijai sukelti naudojami preparatai, skatinantys antralinių folikulų vystymąsi: tai egzogeninių gonadotropinų, GnRH ir steroidų deriniai. Tačiau superovuliacijos efekto nenusipėjamumas, lemiantis didelius embrionų savikainos skirtumus, iki šiol varžo embrionų transplantacijos metodo platesnį praktinį pritaikomumą.

Pagal šiuolaikinius superovuliacijos protokolus superovuliacija gali būti efektyviai atliekama donorėms kas 30 dienų. Atsižvelgiant į galimybes, numatoma, kad superovuliacija gali būti pradedama pirmą parą po rujos (pirmosios folikulų bangos metu), 8–12 parą (antrosios folikulų bangos metu) ir neatsižvelgiant į lytinį ciklą – atlikus folikulų augimo sinchronizaciją (Bo, Mapletoft, 2014).

Nustatyta, kad kiaušidžių funkciniai dariniai, jų dydis siejasi su superovuliacijos rezultatu (Maciel et al., 1995). Pavyzdžiui, nurodoma, kad dominuojantis folikulas slopina kiaušidžių atsaką į egzogeninius gonadotropinus (Kanitz et al., 2002). Slopinant dominuojantį folikulą ir skatinant naujos folikulo augimo bangos susidarymą, superovuliaciją galima sukelti norimu laiku (Mapletoft et al., 2009). Karvių folikului pasiekus apie 10 mm jis įgauna galimybę ovuliuoti (Sartori et al., 2001). Ovuliacinis folikulas yra didesnis už dominuojantį ir siejasi su lytinio ciklo pabaiga (Savio et al., 1988). Paprastai folikulai auga keliomis bangomis, geltonkūnio fone, kuris susidaro ovuliuojus paskutinės lytinio ciklo folikulų augimo bangos folikului. Dėl šios priežasties kiaušidėse dažnai nustatomi folikulai arba geltonkūniai, arba ir folikulai, ir geltonkūniai. Ovuliaciniai folikulai vystosi iš antralinių folikulų – mažų folikulų, jautrių gonadotropinams. Dominuojančio folikulo likimas priklauso nuo geltonkūnio funkcijos. Esant išreikštam folikului ir aukštesnei progesterono koncentracijai, dominuojantis folikulas tampa atrežiškas dėl neigiamos progesterono ir LH įtakos (Ireland et al., 2000). Nykstantis folikulas parakriniškai nustoja slopinti gretimų folikulų vystymąsi, o į egzogeninius gonadotropinus tuo metu sureaguoja tam tikra antralinių folikulų grupė. Tokia teorine prielaida buvo vadovautasi šiame tyrime sukeliant donorėms superovuliaciją, todėl eksperimentui atrinkome karves, kurių kiaušidėse nebuvo didesnių nei 10 mm dydžio folikulų.

Karvės reprodukcinis pajėgumas yra nulemtas genetiškai. Abiejų pusių

kiaušidėse yra panašus germinaliųjų ląstelių skaičius ir jų kiekis gali būti viena iš reprodukcinio pajėgumo variacijos priežasčių (Erickson, 1966). Antralinių (augimo sluoksnio) arba terciolinių (tretinių) (Stroebech et al., 2015) folikulų skaičius kiaušidėse yra praktiškai pastovus dydis ir nulemtas genetiškai (Burns et al., 2005). Cushman ir bendraautorijų duomenimis (1999), nustatyta, kad karvės, turėjusios mažiau pirminių-tretinių folikulų, ne taip efektyviai atsakė į superovuliaciją. Jos taip pat turėjo mažiau antralinių folikulų (Cushman et al., 1999). Superovuliacijos metu iš antralinių folikulų formuojasi keli dominuojantys folikulai. Tuo pagrįstas superovuliacijos fenomenas (Campbell et al., 2013). Kai kurių karvių kiaušidėse folikulų augimo bangos kilimo metu gali pradėti vystytis tik 8, o kitų – net 56 folikulai (Burns et al., 2005).

Antraliniai folikulai išsivysto iš dalies pirminių 3–4 mm dydžio folikulų. Kiaušidžių dydį lemia antraliniai folikulai: didesnėje kiaušidėje randama daugiau antralinių folikulų (Ireland et al., 2007). Jų skaičius gali būti naudojamas norint nuspėti, kaip gyvūnas reaguos į superovuliaciją. Pastebėta, kad prastai reagavę į superovuliaciją gyvūnai turėjo mažiau folikulų prieš superovuliaciją, nei reagavę vidutiniškai ar gerai. Karvės su didesniu mažų folikulų skaičiumi gali daugiau jų užauginti bei subrandinti iki tretinių folikulų ir būti geresnėmis donorėmis. Nustatyta, kad superovuliacija yra efektyvesnė esant didesniai vidutinių folikulų skaičiui (Gong, Webb, 1996). Apskritai atlikti tyrimai įrodo, kad superovuliacija tuo efektyvesnė, kuo daugiau prieš superovuliaciją yra germinaliųjų ląstelių ir įvairių brendimo stadijų folikulų.

Mūsų tyrimo duomenimis nustatyta stipri koreliacija tarp kiaušidžių (kairės kiaušidės  $r=0,843$ ,  $p<0,05$ , dešinės  $r=0,916$ ,  $p<0,05$ ) dydžio prieš superovuliaciją ir atlikus ją, todėl galima teigti, kad folikulų skaičius, nulemiantis kiaušidės dydį prieš superovuliaciją, gali būti vertinamas kaip vienas iš superovuliacijos efektyvumo rodiklių.

Tiksliai nustatyti mažų folikulų kiekį ultragarsiniu tyrimu yra sudėtinga. Žymiai paprastesnis būdas – išmatuoti kiaušidės, kadangi antralinių folikulų skaičius to pačio individo yra pastovus dydis. Nustačius sąsają tarp karvės kiaušidės dydžio ir jos atsako į superovuliaciją įmanoma kiaušidžių dydį vertinti kaip prezumpcinį donorės tinkamumo požymį. Mūsų tyrimas atskleidė, kad kiaušidės dydis iki superovuliacijos turi ženklios įtakos ne vien tik kiaušidžių dydžiui po superovuliacijos, bet ir kiaušidžių funkcinių darinių skaičiui. Gauta vidutinio stiprumo statistinė koreliacija tarp kiaušidžių dydžio ir geltonkūnių skaičiaus nurodo šių rodiklių bendrumą.

Embrionų išgavimo dieną ovuljavusių folikulų vietoje nustatomi geltonkūniai. Remiantis mūsų tyrimo duomenimis, didesnėje prieš superovuliaciją kiaušidėje bus nustatoma daugiau geltonkūnių po

superovuliacijos. Tai sutampa su pastebėjimais, kad nuo antralinių folikulų skaičiaus (vadinasi ir nuo kiaušidžių dydžio) priklauso koks bus atsakas į kiaušidžių stimuliaciją gonadotropiniais, t. y. koks bus superovuliacijos efektyvumas (Cushman et al., 1999).

Tikėtina, kad mažo dydžio kiaušidėse yra mažiau antralinių folikulų, bet primordialinių folikulų (nesivystančių) kiekis, iš kurių vystosi antraliniai folikulai, yra būdingas rūšiai. Mechanizmas, kaip folikulai iš nesivystančių pereina į besivystančių sluoksnį (pirminių, antrinių ir tretinių), yra iki šiol diskutuotinas (Webb et al., 1999). Visiems besivystantiems folikulams yra būtinas gonadotropino poveikis.

Mūsų tyrimo metu nustatyta, kad į superovuliaciją intensyviausiai reagavo karvės, prieš superovuliaciją turėjusios mažiausias kiaušides, kurios po superovuliacijos padidėjo 4–5 kartus, tačiau pagal absoliutų dydį daugiausiai padidėjo didžiausios prieš superovuliaciją III grupės kiaušidės. Išanalizavus mūsų atlikto tyrimo duomenis nustatyta, kad ŽILŠ nestimuliuotų karvių kiaušidės vidutiniškai padidėjo 3,2 karto ( $p < 0,05$ ). Pažymėtina, kad ŽILŠ stimuliuotų karvių kiaušidės atlikus superovuliaciją padidėjo vidutiniškai 2,9 karto ( $p < 0,05$ ) ir tai buvo 16,5 % ( $p < 0,05$ ) mažiau lyginant su ŽILŠ nestimuliuotomis karvėmis. Manome, kad stimuliuotų ŽILŠ karvių mažesnės kiaušidės po superovuliacijos rodo, kad stimuliacija ŽILŠ sinchronizavo ovocitų brendimą ir ovuliaciją, nes ŽILŠ stimuliuotų karvių grupėje po superovuliacijos buvo nustatyta 12,1 % ( $p > 0,05$ ) mažiau folikulų ir buvo rasta 20,5 % ( $p < 0,05$ ) daugiau geltonkūnių nei nestimuliuotų karvių grupėje.

Ieškant būdų kaip padidinti embrionų išeigą kiaušidžių stimuliacijos metu, buvo bandoma didinti gonadotropinų dozę, tačiau nustatyta, kad didinant FSH dozę nepavyksta padidinti ovuliacijai vykusių folikulų skaičiaus. Dėl padidintos FSH dozės po ovuliacijos gana aktyviai vystosi antrinė folikulų banga ir embrionų plovimo metu geltonkūnių nepadaugėja, bet randama daugiau neovuliacijai vykusių folikulų, todėl susidaro didelis estrogenų fonas, (Saumande, 1980) duodantis neigiamą šalutinį efektą. Tai ypač akivaizdu superovuliacijai sukelti naudojant chorioninį gonadotropiną. Kitų mokslininkų nuomone, nekintanti embrionų išeiga (dažnai net mažėjanti didinant FSH dozę) didinant gonadotropinų dozę, gali būti aiškinama dominuojančio folikulo efektu – egzogeninis FSH gali slopinti ovuliaciją (Saumande, Chuppin, 1986; Kanitz et al., 2002). Teigiama, kad naudojant FSH, bet ne chorioninį gonadotropiną, gaunamas didesnis geltonkūnių ir transplantacijai tinkamų embrionų kiekis (Elsden et al., 1978). Tačiau Barros ir kolegos (2008) atlikę tyrimus teigia, kad gydymas su eCG žymiai

padidino ovocitų ir embrionų skaičių. Optimalus estrogenų fonas garantuoja didesnę transplantacijai tinkamų embrionų išeigą (Dieleman et al., 1989).

2013 metais publikuotų tyrimų duomenimis (Mapletoft, Bo, 2013) buvo pastebėta, kad pailgintas FSH gydymo protokolas, nepadidinus naudojamo FSH bendro kiekio, padidina procentinę ovuliuusių folikulų ir ovuliacijų skaičių, taip pat buvo pastebimas padidintas vidutinis visų ovocitų/embrionų, apvaisintų ovocitų ir transplantacijai tinkamų embrionų skaičius. Buvo padaryta išvada, kad pratęstas FSH gydymo protokolas gali būti efektyvi priemonė papildant folikulinę bangą mažais folikulais dėl papildomo laiko, būtino šių folikulų augimui iki ovuliuojančio folikulo dydžio. Šie rezultatai parodo, kad tradiciniai 4 dienų superovuliacijos protokolai galbūt yra per trumpi, nes ne visi folikulų bangoje augantys folikulai įgyja gebėjimą ovuliuoti, todėl gali būti gaunama mažesnė embrionų išeiga (Mapletoft, Bo, 2013).

Otoi su kolegomis (2000) nepastebėjo teigiamo poveikio embrionų išeigai ir kokybei, jei po sėklinimo praėjus 1 parai yra sunaikinami dideli folikulai. Sunaikinus folikulus praėjus 3 paroms po sėklinimo, pastebėtas neigiamas poveikis embrionų kokybei. Kiaušidžių dydis (vadinasi esančių folikulų skaičius) silpnai koreliuoja su folikulų skaičiumi embrionų išgavimo dieną. Superovuliacijos mechanizme svarbų vaidmenį vaidina *theca* ir *granulosa* ląstelių proliferacija (Fricke et al., 1997). Būtent folikulo mikroaplinka yra ypač svarbi folikulų vystymosi procese (Fortune et al., 2004). Kitais žodžiais, reakcija į superovuliaciją priklauso nuo jautrių gonadotropinams folikulų kiekio pradedant gydymą (Driancourt, 2001). Natūralu, kad kiaušidžių dydis prieš superovuliaciją turi įtakos kiaušidžių dariniams, nustatytiems embrionų išgavimo metu.

Mūsų tyrimo duomenimis, yra vidutinio stiprumo statistinė koreliacija tarp geltonkūnių skaičiaus ir kiaušidės dydžio prieš superovuliaciją. Jau minėta, kad superovuliacijos atsaką galima prognozuoti pagal kiaušidžių dydį prieš superovuliaciją. Galima daryti išvadą, kad kiaušidžių atsaką į stimuliaciją gonadotropiniais įtakoja daugiau veiksnių, nes buvo publikuota straipsnių, kad nenustatyta statistiškai patikimos koreliacijos tarp folikulų skaičiaus (pagal mūsų prielaidą ir kiaušidžių dydžio) prieš superovuliaciją ir geltonkūnių bei embrionų išeigos (Fernandes et al., 2002).

Tačiau mūsų tyrimo duomenimis ir kairės ( $r=0,810$ ,  $p<0,05$ ), ir dešinės ( $r=0,871$ ,  $p<0,05$ ) kiaušidės dydis prieš superovuliaciją statistiškai stipriai koreliuoja su išplaunamų embrionų skaičiumi. Daug autorių pastebi, kad 3–6 mm folikulų kiekis prieš superovuliaciją koreliuoja su superovuliacijos atsaku (Romero et al., 1991, Kawamata, 1994). Vyraujančią nuomonę, kad prieš superovuliaciją didesnės apimties kiaušidės lemia didesnę transplantacijai tinkamų embrionų išeigą, patvirtina mūsų tyrimo rezultatai.

Tyrimo metu nustatėme stiprų ir statistiškai patikimą koreliacinį ryšį tarp abiejų pusių kiaušidžių dydžio prieš superovuliaciją ir transplantacijai tinkamų embrionų skaičiaus (kairės kiaušidės  $r=0,701$ ,  $p<0,05$ , dešinės –  $r=0,712$ ,  $p<0,05$ ). Nustatyta, kad kuo didesnė kiaušidė prieš superovuliaciją, tuo didesnis bus transplantacijai tinkamų embrionų skaičius. Mūsų eksperimento metu iš didžiausias kiaušides prieš superovuliaciją turėjusių karvių išplauta 3,7 karto ( $p<0,05$ ) daugiau embrionų ir gauta 3,1 karto ( $p<0,05$ ) daugiau transplantacijai tinkamų embrionų lyginant su mažiausias I grupės kiaušides turėjusiomis karvėmis. Tyrimo metu nustatyta, kad embrionų išeiga ženkliai padidina kiaušidžių stimuliacija ŽILŠ superovuliacijos metu. ŽILŠ stimuliuotų karvių grupėje buvo išplauta vidutiniškai 29 % ( $p<0,05$ ) embrionų daugiau ir gauta vid. 15,9 % ( $p>0,05$ ) daugiau transplantacijai tinkamų embrionų, nei nestimuliuotų karvių grupėje.

Sprendžiant pagal antimiulerinio hormono koncentraciją, kuris yra daugeliui patelių rūšių kiaušidžių reprodukcinio pajėgumo žymuo, karvių gebėjimas reaguoti į superovuliaciją yra nevienodas (Ilha et al., 2016). Nustatyta, kad analogiška gonadotropinų dozė sukelia skirtingą atsaką, todėl embrionų išeiga skiriasi. Karvėms su mažesniu reprodukcinio pajėgumu taikoma per didelė gonadotropinų dozė sukelia netinkamą ovocitams vystymosi aplinką, blogina ovocitų kokybę ir embrionų išeigą.

Mūsų duomenimis kiaušidžių reakcija į superovuliaciją priklauso nuo kiaušidžių padėties kūno pusės atžvilgiu. Reprodukcinio aparato funkcinis asimetriškumas pastebėtas daugumos tyrėjų. Gereš su kolegomis (2011) atliko tyrimą su holšteinų-fryzų veislės pieninėmis karvėmis, buvo nustatyta, kad embrionas dažniau vystosi dešiniajame gimdos raga. Teigiama, kad pirmoji ovuliacija po atsivedimo dažniau įvyksta priešingoje kiaušidėje, nei buvo veršingumas, o apsėklus į priešingą nei vystėsi embrionas ragą, karvės dažniau tapdavo veršingos, nei sėklinant į tą patį. Patvirtinti ir pastebėjimai, kad spermos depozicijos vieta ir buvusio veršingumo pusė turi įtakos apsisėdinimo efektyvumui (Lopez-Gatius, 1996) ir kad dešinioji kiaušidė yra aktyvesnė už kairiąją (Alvarez et al., 2005). Atlikti tyrimai patvirtina, kad ovuliacija dažniau įvyksta dešinėje kiaušidėje nei kairėje, taip pat embrionai dažniau vystosi dešiniajame gimdos raga (Lopez-Gatius, 1997; Giraldo et al., 2010). Dešiniajame gimdos raga išsivysto ir yra atvedami sunkesni veršeliai nei kairiajame raga. Pusė, kurioje vystėsi embrionas, reikšmingos įtakos veršingumo trukmei neturi. Pranešama, kad iš dešiniojo gimdos rago gauti embrionai dažniausiai yra buliukai (Hylan et al., 2009).

Mūsų duomenimis, dešinioji kiaušidė yra didesnė ir į superovuliaciją reagavo labiau nei kairioji. Prieš superovuliaciją nustatytas kiaušidžių

dydžio skirtumas (dešinės pusės kiaušidės vid. 24,7 % ( $p<0,05$ ) didesnės) išliko ir po superovuliacijos – dešinės pusės kiaušidės buvo didesnės vidutiniškai 21,4 % ( $p<0,05$ ) stimuliuotų ŽILŠ ir 27,3 % ( $p<0,05$ ) nestimuliuotų karvių grupėse.

Mūsų gauti rezultatai sutampa su kitų tyrėjų duomenimis, kurie teigia, kad dešinės pusės kiaušidė paprastai yra ne tik didesnė savo dydžiu, bet ir aktyvesnė (Pierson, Ginther, 1987). Mūsų duomenimis dešinės pusės kiaušidėse nustatyta vidutiniškai 26,29 % ( $p<0,05$ ) daugiau folikulų ir vid. 44,5 % ( $p<0,05$ ) daugiau geltonkūnių.

Gereš ir kolegų (2011) gauti rezultatai patvirtino melžiamų karvių reprodukcinį organų fiziologinį asimetriškumą, atsirandantį dėl kiaušidžių veiklos ir kiaušidžių struktūros skirtumų. Nustatyta, kad reprodukcinio aparato asimetrija siejasi ir su nevienoda gimdos ragų atžvilgiu tam tikrų angliavandenių, baltymų ir progesterono koncentracija. Alvarez su kolegomis (2005) pastebėjo, kad atlikus superovuliaciją inbridingas turi įtakos skirtingam geltonkūnių skaičiui kairės ir dešinės pusės kiaušidėse.

Daugelio mokslininkų straipsniuose pastebėta, kad jau nuo pereito šimtmečio VIII dešimtmečio mažėja pieninių karvių vaisingumas. Pagrindinė šio reiškinio priežastis – prastėjanti ovocitų ir ankstyvųjų embrionų kokybė, bei padidėjęs embrioninis mirtingumas. Siekiant sumažinti neigiamą energijos balansą, pieninės karvės yra šeriamos gausiai angliavandeniais prisotintu racionu. Tokia insulinogeninė dieta turi neigiamos įtakos angliavandenių – riebalų apykaitai. Baltymingi pašarai padidina organizme amoniako – šlapalo koncentraciją. Šiuolaikinių pieninių karvių mityboje didelę reikšmę turintys riebalai keičia steroidų apykaitą ir įtakoja ovocito-embriono mikroaplinką (Leroy et al., 2008; Leroy et al., 2014).

Mūsų tyrimui buvo naudojamos aukšto produktyvumo pieninės karvės 75–90 laktacijos parą. Didelė pieno produkcija gali būti viena priežasčių, paaiškinančių didesnę nei 33 % skirtumą tarp išplautų ir transplantacijai tinkamų embrionų skaičiaus. Didelis pieningumas siejasi su žema progesterono koncentracija 5–7 parą po apvaisinimo ir prastesnėmis sąlygomis ankstyviesiems embrionams išgyventi (Stronge et al., 2005). Pavyzdžiui, telyčios, atlikus superovuliaciją, produkuoja daugiau ir geresnės kokybės embrionų, nei pieninės karvės. Tai siejama su gebėjimu produkuoti daugiau progesterono. Pastebima, kad didesnė progesterono koncentracija nesiejama su intensyvesne ovuliacija ir geltonkūnių skaičiumi (Chagas e Silva et al., 2002). Angliavandenių apykaitos reguliacijoje dalyvauja IGF. Jis skatina mitozę ir pasižymi anti-apoptotiniu veikimu. Būtent šis faktorius turi didelės įtakos ovocitų kokybei ir gebėjimui apsivaisinti (Velazquez et al., 2009).

Embrionų transplantacijoje būdinga, kad atlikus superovuliaciją gautų embrionų kokybė ir išsivystymo stadija skiriasi. Gyvybingi embrionai pagal išsivystymą dažniausiai skiriasi 24–48 valandomis, bet jų prigijimui didesnę reikšmę turi kokybė (Lindner, Wright, 1983). Ovocito, iš kurio gali vystytis embrionas, kokybė priklauso nuo hormoninės stimuliacijos būdo, laiko, dozės, superovuliacijos schemos (Sirard et al., 2006). Ovocitų kokybė embrionų transplantacijoje yra itin svarbi, todėl šiuo metu ieškoma naujų būdų jų kokybei gerinti. Bandomi įvairūs alternatyvūs gonadotropinams stimuliacijos metodai (McNatty et al., 2014).

Mūsų tyrimais nustatytas teigiamas ŽILŠ stimuliacijos poveikis embrionų išsivystymui ir jų kokybei. Nustatyta, kad kiaušidžių stimuliacija ŽILŠ sinchronizuoja ovuliaciją, nes iš stimuliuotų karvių išplovėme nežymiai mažiau neapvaisintų ovocitų ir 4,89 % ( $p < 0,05$ ) gavome daugiau ankstyvųjų blastocistų ir 3,82 % ( $p > 0,05$ ) blastocistų lyginant su nestimuliuotų karvių grupe. Be to, iš ŽILŠ stimuliuotų karvių išplauta 4,12 % ( $p < 0,05$ ) daugiau puikių (I kokybės klasės) embrionų ir 2,02 % ( $p > 0,05$ ) mažiau negyvų ar degeneruotų (IV kokybės klasės) embrionų nei iš nestimuliuotų karvių.

Pastarųjų metų duomenimis teigiamas šviesos poveikis lytinėms ląstelėms yra siejamas su mitochondrijų citochromoksidazės fotoreceptorine funkcija (Iaffaldano et al., 2016). Bandymais su in vitro produkuojamais embrionais, apšvitinus lazeriu pastebėta, kad ženkliai padidėja kumuliuoto ląstelių mitochondrijų membranų potencialas. Kartu padidėja ir ląstelių ciklą reguliuojančio baltymo – ciklino B koncentracija. Ovocituose padidėja mitozės aktyvatoriaus – proteinkinazės aktyvumas. Daroma išvada, kad lazerio šviesa yra efektyvi priemonė, taikytina reguliuojant granuliozinių ląstelių ir ovocito metabolizmą (Soares et al., 2014). Tyrimai rodo, kad sąveika tarp lazerio spinduliuotės ir ląstelių vyksta dėl fotonų absorbcijos fotoreceptoruose. Yra sukeltos cheminės reakcijos, tokios kaip gliukolizė ir oksidacinis fosforilinimas. Kaip vienas iš galimų fotoreceptorių, galinčių sąveikauti su lazerio šviesa, yra citochromoksidazė C. Šios sąveikos metu mitochondrijų vidinės membranos didina ATP sintezę. Šie procesai pagreitina RNR transkripciją ir DNR replikaciją, todėl ŽILŠ stimuliacija yra veiksminga priemonė moduluoti grūdėtųjų ląstelių ir ovocito metabolizmą (Moreno-Millan, Ocana-Quero, 2009). Naudojant žemo intensyvumo lazerius yra sukeliamas teigiamas poveikis greitesniam ovocitų brendimui, apvaisinimui ir tinkamam embriono išsivystymui (Abdel-Salam, Harith, 2015). Lazerio šviesos poveikis oocitams yra nevienareikšmis. Nesubrendusiems ovocitams in vitro lazerio šviesa padidina degeneracijos ir nepilnaverčio vystymosi (diploidiniai ovocitai) tikimybę (Ocana-Quero et al., 1998; Ebner et al., 2005).

Literatūroje nurodoma, kad vienas iš embriono kokybės žymenų yra mitochondrijų būklė (Wang, Sun, 2007). Todėl pagrindinis lazerio šviesos poveikis yra siejamas su mitochondrijų funkcijos pagerinimu stimuliuojant ŽILŠ kiaušidžių folikuluose besivystančių ovocitų granuliozines ląsteles pirmomis jų brendimo valandomis (Passarella et al., 1984). Po tokios stimuliacijos mitochondrijose padidėja ATP sintezė, dėl vykstančių reakcijų ovocitas greičiau subręsta ir palieka folikulą (Soares et al., 2014).

Kadangi mūsų eksperimento metu paskutinį kartą stimuliacija ŽILŠ buvo atliekama praėjus 1 val. po sėklinimo, todėl manome, kad didesnę ir statistiškai reikšmingą ŽILŠ stimuliuotų karvių embrionų išeigą galėjo lemti sėkmingas ovocitų apvaisinimas. Šią prielaidą grindžiame tuo, kad daugeliu ankstesnių tyrimų buvo nustatytas teigiamas stimuliacijos ŽILŠ poveikis spermatozoidų judrumui ir apvaisinimo galiai. Nustatyta, kad lazerio stimuliacija padidina ATP gamybą mitochondrijose, todėl dėl jo poveikio ląstelėse padidėja energijos kiekis. Kadangi spermatozoidų judrumas ir ovocitų brendimas priklauso nuo ląstelėje esančios energijos, todėl dėl lazerio šviesos poveikio padidėjęs energijos kiekis yra labai svarbus šiems procesams (Abdel-Salam, Harith, 2015).

Taigi, lazerio šviesa optimizuojamas lytinės ląstelės ciklas (Zhang et al., 2014) galėtų būti pagrindinis veiksnys, siejamas su teigiamu lazerio šviesos poveikiu embrionų kiekiui ir kokybei.

Vertinant, koks lazerio poveikis stimuliuojamų kiaušidžių funkciniam dariniams ir embrionų išeigai, buvo nustatyta, kad švitintų lazeriu donorių grupėje embrionų išplovimo dieną nustatyta mažiau folikulų, nei kontrolinėje. Lazeriu švitintoje grupėje didesnis geltonkūnių skaičius siejamas su optimaliu gonadotropino poveikiu. Sinchronizuotos rujos metu, lazeriu paveiktoje grupėje ovuliavo folikulų daugiau, nei kontrolinėje. Apie tai liudija didesnis geltonkūnių skaičius ir daugiau išgautų embrionų. Tai gali būti grindžiama tuo, kad dėl gonadotropinų poveikio intensyvėja mitochondrijų aktyvumas. Lazerio šviesos akceptorius – ląstelėje esantys mitochondrijos fermentai – kvėpavimo grandinė (Karu, 1989, 2010).

## IŠVADOS

**1. Profilaktinė karvių stimuliacija žemo intensyvumo lazerio šviesa (ŽILŠ) ankstyvuoju pp periodu turėjo teigiamos įtakos greitesniam kiaušidžių funkcijos atsistatymui ir visavertiškam ovocitų subrendimui. Nustatytas teigiamas ŽILŠ stimuliacijos poveikis pieninių karvių reprodukcijos rodikliams:**

1.1. pirmo sėklinimo laikui (laikotarpiui nuo apsiveršavimo iki pirmo sėklinimo);

1.2. veršiamosios–apsivaisinimo periodui (laikotarpiui nuo apsiveršavimo iki apsivaisinimo).

**2. Kiaušidžių stimuliacija ŽILŠ superovuliacijos metu turėjo įtakos kiaušidžių dydžiui po superovuliacijos, geltonkūnių, folikulų skaičiui ir embrionų išeigai:**

2.1. ŽILŠ stimuliuotų karvių kiaušidės atlikus superovuliaciją padidėjo mažiau nei ŽILŠ nestimuliuotų karvių;

2.2. stimuliacija ŽILŠ superovuliacijos metu gerina superovuliacijos efektyvumą pagal folikulų ir geltonkūnių skaičių. ŽILŠ stimuliuotų karvių kiaušidėse nustatyta mažiau folikulų ir daugiau geltonkūnių nei nestimuliuotų karvių grupėje;

2.3. superovuliacijos metu ŽILŠ stimuliuotų karvių grupėje išplauta vid. 29 % ( $p < 0,05$ ) embrionų daugiau ir gauta vid. 15,9 % ( $p > 0,05$ ) daugiau transplantacijai tinkamų embrionų nei nestimuliuotų karvių grupėje.

**3. Nustatytos sąsajos tarp kiaušidžių dydžio, jų padėties kūno pusės atžvilgiu prieš superovuliaciją ir superovuliacijos rezultatų:**

3.1. pagal kiaušidžių dydį prieš superovuliaciją galima prognozuoti busimą jų dydį po superovuliacijos. Nustatytas stiprus koreliacinis ryšys tarp kiaušidžių dydžio prieš ir po superovuliacijos.

3.2. prieš superovuliaciją nustatytas kiaušidžių dydžio skirtumas išliko ir po superovuliacijos – dešinės pusės kiaušidės buvo didesnės vidutiniškai 21,4 % ( $p < 0,001$ ) stimuliuotų ŽILŠ ir 27,3% ( $p < 0,01$ ) nestimuliuotų karvių grupėse;

3.3. nustatytas efektyvesnis dešinės pusės kiaušidžių atsakas į superovuliaciją pagal funkcinį darinių skaičių po superovuliacijos;

3.4. silpniausiai į superovuliaciją pagal geltonkūnių skaičių reaguoja mažiausias (I grupės), o efektyviausiai – didžiausias (III grupės) kiaušidės prieš superovuliaciją turinčios karvės;

3.5. nustatytas stiprus koreliacinis ryšys tarp kiaušidžių dydžio prieš superovuliaciją ir išplautų ir transplantacijai tinkamų embrionų skaičiaus.

**4. Nustatytas teigiamas stimuliacijos ŽILŠ poveikis embrionų išsivystymui ir jų kokybei:**

4.1. kiaušidžių stimuliacija ŽILŠ efektyviau sinchronizuoja ovuliaciją. Iš ŽILŠ stimuliuotų karvių išplauta mažiau neapvaisintų ovocitų ir daugiau ankstyvųjų blastocistų, ir blastocistų lyginant su nestimuliuotų karvių grupe;

4.2. iš ŽILŠ stimuliuotų karvių išplauta daugiau puikių (I klasės) ir mažiau negyvų ar degeneruotų embrionų (IV kokybės klasė) nei iš nestimuliuotų karvių.

## REKOMENDACIJOS

1. Remiantis gautais rezultatais siūlome naudoti stimuliaciją žemo intensyvumo lazerio šviesa (ŽILŠ), kaip papildomą, ekologišką ir efektyvią priemonę reprodukcinų sutrikimų gydymui ir profilaktikai.

2. Siekiant sumažinti superovuliacijos nenuospėjamumą rekomenduojame 9500–10 500 kg pieno per praeitą laktaciją davusioms 2–4 laktacijos Lietuvos juodmargėms 75–90 parą *pp* ultragarsu prieš superovuliaciją išmatuoti kiaušides ir superovuliaciją sukelti tik tokioms donorėms, kurių kiaušidėse nėra didesnių kaip 10 mm folikulų, yra didesnis nei 10 mm geltonkūnis, o dešinės pusės kiaušidės yra didesnės nei 1235 mm<sup>2</sup>.

3. Norint padidinti transplantacijai tinkamų embrionų skaičių ir pagerinti jų kokybę reikia superovuliacijos metu stimuliuoti karvių kiaušides ŽILŠ. Kiaušidžių stimuliaciją tikslinga pradėti pirmą superovuliacijos protokolo dieną lazerio prietaisu, kurio skleidžiamų šviesos bangų ilgis yra 870–970 nm, spinduliuotės galia – 65,93 J/cm<sup>2</sup>, dažnio diapazonas nuo 20 iki 2000 Hz, o impulsų trukmė – apie 1 sek. Rekomenduojame stimuliuoti 1 kartą per parą po 3 min., 10 parų iš eilės. Stimuliacijos metu lėtai keisti lazerio padėtį, švitinant 40x50 cm (2000 cm<sup>2</sup>) kryžiaus srities plotą, 5 cm atstumu nuo odos paviršiaus. Paskutinė stimuliacija ŽILŠ turi būti atlikta rijos metu praėjus 1 val. po sėklinimo.

## LITERATŪROS ŠALTINIAI

1. Abdel-Salam Z., Dessouki S. H. M., Abdel-Salam S. A. M., Ibrahim M. A. M., Harith M. A. Green laser irradiation effects on buffalo semen. *Theriogenology*. 2011. Vol. 75. P. 988–994.
2. Abdel-Salam Z., Harith M. A. Laser researches on livestock semen and oocytes: A brief review. *J Adv Res*. 2015. Vol. 6. P. 311–317.
3. Acosta T. J., Ozawa T., Kobayashi S., Hayashi K., Ohtani M., Kraetzl W. D., Sato K., Schams D., Miyamoto A. Periovulatory changes in the local release of vasoactive peptides, prostaglandin F<sub>2α</sub>, and steroid hormones from bovine mature follicles in vivo. *Biol Reprod*. 2000. Vol. 63. P. 1253–1261.
4. Adams G. P. Comparative patterns of follicle development and selection in ruminants. *J Reprod Fertil Suppl*. 1999. Vol. 54. P. 17–32.
5. Adams G. P. Control of ovarian follicular wave dynamics in cattle: Implications for synchronization and superstimulation. *Theriogenology*. 1994. Vol. 41. P. 19–24.
6. Adams G. P., Jaiswal R., Singh J., Malhi P. Progress in understanding ovarian follicular dynamics in cattle. *Theriogenology*. 2008. Vol. 69. P. 72–80.
7. Adams G. P., Kot K., Smith C. A., Ginther O. J. Effect of the dominant follicle on regression of its subordinates in heifers. *Can J Anim Sci*. 1993. Vol. 73. P. 267–275.
8. Adams G. P., Kot K., Smith C. A., Ginther O. J. Selection of a dominant follicle and suppression of follicular growth in heifers. *Anim Reprod Sci*. 1993. Vol. 30. P. 259–271.
9. Adams G. P., Matteri R. L., Kastelic J. P., Ko J. C. H., Ginther O. J. Association between surges of follicle-stimulating hormone and the emergence of follicular waves in heifers. *J Reprod Fertil*. 1992. Vol. 94. P. 177–188.
10. Adams G. P., Nasser L. F., Bo G. A., Garcia A., Del Campo M. R., Mapletoft R. J. Superovulatory response of ovarian follicles of Wave 1 versus Wave 2 in heifers. *Theriogenology*. 1994. Vol. 42. P. 1103–1113.
11. Alekseenko A. V., Palianitsa S. I., Tarabanchuk V. V., Seniutovich R. V., Stoliar V. F. Treatment of suppurative mastitis using laser irradiation and continuous electric current. *Vestn Khir Im I I Grek*. 1987. Vol. 139. P. 54–57.
12. Alvarez R. H., da Silva M. V. G. B., de Carvalho J. B. P., Binelli M. Effects of inbreeding on ovarian responses and embryo production from

superovulated Mantiqueira breed cows. *Theriogenology*. 2005. Vol. 64. P. 1669–1676.

13. Amiridis G. S., Tsiligianni T., Vainas E. Follicle ablation improves the ovarian response and the number of collected embryos in superovulated cows during the early stages of lactation. *Reprod Domest Anim*. 2006. Vol. 41. P. 402–407.

14. Anderson M. L., BonDurant R. H., Corbeil R. R., Corbeil L. B. Immune and inflammatory responses to reproductive tract infection with *Tritrichomonas foetus* in immunized and control heifers. *J Parasitol*. 1996. Vol. 82. P. 594–600.

15. Andrade J. C. O., Oliveira M. A. L., Lima P. F., Guido S. I., Bartolomeu C. C., Tenorio Filho F., Pina V. M. R., Iunes-Souza T. C., Paula N. R. O., Freitas J. C. C. The use of steroid hormones in superovulation of Nelore donors at different stages of estrous cycle. *Anim Reprod Sci*. 2003. Vol. 77. P. 117–125.

16. Arlt S. Naturheilverfahren auf dem Prüfstand. *Tierarztl Umschau*. 2006. Vol. 61. P. 332–333.

17. Arlt S., Padberg W., Drillich M., Heuwieser W. Efficacy of homeopathic remedies as prophylaxis of bovine endometritis. *J Dairy Sci*. 2009. Vol. 92. P. 4945–4953.

18. Armstrong D. T. Recent advances in superovulation of cattle. *Theriogenology*. 1993. Vol. 39. P. 7–24.

19. Azawi O. I. Postpartum uterine infection in cattle. *Anim Reprod Sci*. 2008. Vol. 105. P. 187–208.

20. Azawi O. I., Omran S. N., Hadad J. J. Clinical, bacteriological, and histopathological study of toxic puerperal metritis in Iraqi buffalo. *J Dairy Sci*. 2007. Vol. 90. P. 4654–4660.

21. Bayat M., Vasheghani M. M., Razavi N. Effect of low-level helium-neon laser therapy on the healing of third-degree burns in rats. *J Photochem Photobiol B*. 2006. Vol. 83. P. 87–93.

22. Balik A., Kretschmannova K., Mazna P., Svobodova I., Zemkova H. Melatonin action in neonatal gonadotrophs. *Physiol Res*. 2004. Vol. 53. Suppl 1. P. S153–S166.

23. Ball P. J. H., Peters A. R. *Reproduction in cattle*. Third edition. Oxford. 2004.

24. Baracaldo M. I., Martinez M. F., Adams G. P., Mapletoft R. J. Superovulatory response following transvaginal follicle ablation in cattle. *Theriogenology*. 2000. Vol. 53. P. 1239–1250.

25. Barati F., Niasari-Naslaji A., Bolourchi M., Sarhaddi F., Razavi K., Naghzali E., Thatcher W. W. Superovulatory response of Sistani cattle to

three different doses of FSH during winter and summer. *Theriogenology*. 2006. Vol. 66. P. 1149–1155.

26. Barlund C. S., Carruthers T. D., Waldner C. L., Palmer C. W. A comparison of diagnostic techniques for postpartum endometritis in dairy cattle. *Theriogenology*. 2008. Vol. 69. P. 714–723.

27. Barnes F. L. The effects of the early uterine environment on the subsequent development of embryo and fetus. *Theriogenology*. 2000. Vol. 53. P. 649–658.

28. Barros C. M., Barcelos A. C. Z., Gouvea L. M., Meneghel M., Barcelos D. S., Barcelos L. N., Trinca L. A. Improvement of a superstimulatory protocol in Nelore cows: replacing the last two doses of pFSH by eCG. *Reprod Fertil Dev*. 2008. Vol. 20. P. 152.

29. Barros C. M., Nogueira M. F. G. Superovulacao em zebuinos de corte. In *Anais do 1 o Simposio Internacional de Reproducao Animal Aplicada*. Londrina. 2004. P. 212–222.

30. Baruselli P. S., Ferreira R. M., Sales J. N. S., Gimenes L. U., Sa Filho M. F., Martins C. M., Rodrigues C. A., Bo G. A. Timed embryo transfer programs for management of donor and recipient cattle. *Theriogenology*. 2011. Vol. 76. P. 1583–1593.

31. Baruselli P. S., Sa Filho M. F., Martins C. M., Nasser L. F., Nogueira M. F. G., Barros C. M., Bo G. A. Superovulation and embryo transfer in *Bos indicus* cattle. *Theriogenology*. 2006. Vol. 65. P. 77–88.

32. Beg M. A., Bergfelt D. R., Kot K., Wiltbank M. C., Ginther O. J. Follicular – Fluid factors and Granulosa – Cell Gene Expression Associated with Follicle Deviation in Cattle. *Biol Reprod*. 2001. Vol. 64. P. 432–441.

33. Benyei B., Gaspard A., Komlosi I., Pecs A. Repeatability and heritability of ovulation number and embryos in dam-daughters pairs in superovulated Holstein-Friesian cows. *Reprod Domest Anim*. 2004. Vol. 39. P. 99–102.

34. Benzaquen M. E., Risco C. A., Archbald L. F., Melendez P., Thatcher M. J., Thatcher W. W. Rectal temperature, calving-related factors, and the incidence of puerperal metritis in postpartum dairy cows. *J Dairy Sci*. 2007. Vol. 90. P. 2804–2814.

35. Bergfelt D. R., Lightfoot K. C., Adams G. P. Ovarian synchronization following ultrasound-guided transvaginal follicle ablation in heifers. *Theriogenology*. 1994. Vol. 42. P. 895–907.

36. Bergfelt D. R., Bo G. A., Mapletoft R. J., Adams G. P. Superovulatory response following ablation-induced follicular wave emergence at random stages of the oestrus cycle in cattle. *Anim Reprod Sci*. 1997. Vol. 49. P. 1–12.

37. Berlinguer F., Leoni G. G., Succu S., Spezzigu A., Madeddu M., Satta V., Bebbere D., Contreras-Solis I., Gonzalez-Bulnes A., Naitana S. Exogenous melatonin positively influences follicular dynamics, oocyte developmental competence and blastocyst output in a goat model. *J Pineal Res.* 2009. Vol. 46. P. 383–391.
38. Betteridge K. J. A history of farm animal embryo transfer and some associated techniques. *Anim Reprod Sci.* 2003. Vol. 79. P. 203–244.
39. Betteridge K. J. An historical look at embryo transfer. *J Reprod Fertil.* 1981. Vol. 62. P. 1–13.
40. Binelli M., Hampton J., Buhi W. C., Thatcher W. W. Persistent Dominant Follicle Alters Pattern of Oviductal Secretory Proteins from Cows at Estrus. *Biol Reprod.* 1999. Vol. 61. P. 127–134.
41. Bleach E. C. L., Glencross R. G., Feist S. A., Groome N. P., Knight P. G. Plasma inhibin A in heifers: Relationship with follicle dynamics, gonadotropins, and steroids during the estrous cycle and after treatment with bovine follicular fluid. *Biol Reprod.* 2001. Vol. 64. P. 743–752.
42. Blikslager A. T., Tate L. P., Weinstock D. Effects of neodymium:yttrium aluminum garnet laser irradiation on endometrium and on endometrial cysts in six mares. *Vet Surg.* 1993. Vol. 22. P. 351–356.
43. Blondin P., Vigneault C., Nivet A. L., Sirard M. A. Improving oocyte quality in cows and heifers - What have we learned so far? *Anim Reprod.* 2012. Vol. 9. P. 281–289.
44. Bo G. A., Adams G. P., Caccia M., Martinez M., Pierson R. A., Mapletoft R. J. Ovarian follicular wave emergence after treatment with progestogen and estradiol in cattle. *Anim Reprod Sci.* 1995. Vol. 39. P. 193–204.
45. Bo G. A., Adams G. P., Nasser L. F., Pierson R. A., Mapletoft R. J. Effect of estradiol valerate on ovarian follicles, emergence of follicular waves and circulating gonadotropins in heifers. *Theriogenology.* 1993. Vol. 40. P. 225–239.
46. Bo G. A., Adams G. P., Pierson R. A., Mapletoft R. J. Exogenous control of follicular wave emergence in cattle. *Theriogenology.* 1995. Vol. 43. P. 31–40.
47. Bo G. A., Baruselli P. S., Chesta P. M., Martins C. M. The timing of ovulation and insemination schedules in superstimulated cattle. *Theriogenology.* 2006. Vol. 65. P. 89–101.
48. Bo G. A., Baruselli P. S., Moreno D., Cutaia L., Caccia M., Tribulo R., Tribulo H., Mapletoft R. J. The control of follicular wave development for self-appointed embryo transfer programs in cattle. *Theriogenology.* 2002. Vol. 57. P. 53–72.

49. Bo G. A., Carballo Guerrero D., Adams G. P. Alternative approaches to setting up donor cows for superstimulation. *Theriogenology*. 2008. Vol. 69. P. 81–87.
50. Bo G. A., Carballo Guerrero D., Tribulo A., Tribulo H., Tribulo R., Rogan D., Mapletoft R. J. New approaches to superovulation in the cow. *Reprod Fertil Dev*. 2010. Vol. 22. P. 106–112.
51. Bo G. A., Hockley D. K., Nasser L. F., Mapletoft R. J. Superovulatory response to a single subcutaneous injection of Folltropin-V in beef cattle. *Theriogenology*. 1994. Vol. 42. P. 963–975.
52. Bo G. A., Mapletoft R. J. Historical perspectives and recent research on superovulation in cattle. *Theriogenology*. 2014. Vol. 81. P. 38–48.
53. Bo G. A., Mapletoft R. J. Evaluation and classification of bovine embryos. *Anim Reprod*. 2013. Vol. 10. P. 344–348.
54. Bondurant R. H. Inflammation in the bovine female reproductive tract. *J Anim Sci*. 1999. Vol. 77. Suppl. 2. P. 101–110.
55. Buchholz J., Wergin M., Walt H., Grafe S., Bley C. R., Kaser-Hotz B. Photodynamic therapy of feline cutaneous squamous cell carcinoma using a newly developed liposomal photosensitizer: preliminary results concerning drug safety and efficacy. *J Vet Intern Med*. 2007. Vol. 21. P. 770–775.
56. Bungartz L., Niemann H. Assessment of the presence of a dominant follicle and selection of dairy cows suitable for superovulation by a single ultrasound examination. *J Reprod Fertil*. 1994. Vol. 101. P. 583–591.
57. Burns D. S., Jimenez-Krassel F., Ireland J. L., Knight P. G., Ireland J. J. Numbers of antral follicles during follicular waves in cattle: evidence for high variation among animals, very high repeatability in individuals, and an inverse association with serum follicle-stimulating hormone concentrations. *Biol Reprod*. 2005. Vol. 73. P. 54–62.
58. Butler S. A. A., Phillips N. J., Boe-Hansen G. B., Bo G. A., Burns B. M., Dawson K., McGowan M. R. Animal-Level Factors Affecting Ovarian Function in *Bos indicus* Heifers Treated to Synchronize Ovulation with Intravaginal Progesterone-Releasing Devices and Oestradiol Benzoate. *Reprod Domest Anim*. 2012. Vol. 47. P. 463–471.
59. Cairoli F., Ferrario L., Carli S., Soldano F. Efficacy of oxytetracycline and tetracycline-benzylamine in the prevention of infection after placental retention in cattle. *Vet Rec*. 1993. Vol. 133. P. 394–395.
60. Calin M. A., Coman T. The laser in veterinary medicine. *Turk J Vet Anim Sci*. 2011. Vol. 35. P. 351–357.
61. Campbell J. R., Kenealy M. D., Campbell K. L. *Animal sciences: the biology, care, and production of domestic animals*. Illinois. 2013.

62. Carballo Guerrero D., Tribulo A., Tribulo R., Tribulo H., Bo G. A. Superovulatory response in beef cattle treated during the first follicular wave following synchronization of ovulation with a progestin device and GnRH. *Reprod Fertil Dev.* 2009. Vol. 21. P. 242–243.
63. Carballo Guerrero D., Tribulo A., Tríbulo R., Tribulo H., Bo G. A. Superovulatory response in beef donors treated during the first follicular wave or four days after progesterone and estradiol administration. *Reprod Fertil Dev.* 2010. Vol. 22. P. 358.
64. Carvalho P. D., Souza A. H., Amundson M. C., Hackbart K. S., Fuenzalida M. J., Herlihy M. M., Ayres H., Dresch A. R., Vieira L. M., Guenther J. N., Grummer R. R., Fricke P. M., Shaver R. D., Wiltbank M. C. Relationships between fertility and postpartum changes in body condition and body weight in lactating dairy cows. *J Dairy Sci.* 2014. Vol. 97. P. 3666–3683.
65. Chagas e Silva J., Lopes da Costa L., Robalo Silva J. Embryo yield and plasma progesterone profiles in superovulated dairy cows and heifers. *Anim Reprod Sci.* 2002. Vol. 69. P. 1–8.
66. Chuffa L. G., Seiva F. R., Favaro W. J., Teixeira G. R., Amorim J. P., Mendes L. O., Fioruci B. A., Pinheiro P. F., Fernandes A. A., Franci J. A., Delella F. K., Martinez M., Martinez F. E. Melatonin reduces LH, 17 beta-estradiol and induces differential regulation of sex steroid receptors in reproductive tissues during rat ovulation. *Reprod Biol Endocrinol.* 2011. Vol. 9. P. 108.
67. Chung H., Dai T., Sharma S. K., Huang Y. Y., Carroll J. D., Hamblin M. R. The nuts and bolts of low-level laser (light) therapy. *Ann Biomed Eng.* 2012. Vol. 40. P. 516–533.
68. Ciccioli N. H., Wettemann R. P., Spicer L. J., Lents C. A., White F. J., Keisler D. H. Influence of body condition at calving and postpartum nutrition on endocrine function and reproductive performance of primiparous beef cows. *J Anim Sci.* 2003. Vol. 81. P. 3107–3120.
69. Colazo M. G., Martinez M. F., Small J. A., Kastelic J. P., Burnley C. A., Ward D. R., Mapletoft R. J. Effect of estradiol valerate on ovarian follicle dynamics and superovulatory response in progestin-treated cattle. *Theriogenology.* 2005. Vol. 63. P. 1454–1468.
70. Corral-Baques M. I., Rigau T., Rivera M., Rodriguez J. E., Rigau J. Effect of 655-nm diode laser on dog sperm motility. *Lasers Med Sci.* 2005. Vol. 20. P. 28–34.
71. Corral-Baques M. I., Rivera M. M., Rigau T., Rodriguez-Gil J. E., Rigau J. The effect of low-level laser irradiation on dog spermatozoa motility is dependent on laser output power. *Lasers Med Sci.* 2009. Vol. 24. P. 703–713.

72. Crowe M. A. Resumption of ovarian cyclicity in post-partum beef and dairy cows. *Reprod Domest Anim.* 2008. Vol. 43. Suppl. 5. P. 20–28.
73. Crowe M. A., Mullen M. P. Regulation and Function of Gonadotropins Throughout the Bovine Oestrous Cycle. In *Gonadotropin*; Vizcarra J. Ed.; Rijeka. 2013. P. 143–154.
74. Crowe M. A., Padmanabhan V., Mihm M., Beitins I. Z., Roche J. F. Resumption of follicular waves in beef cows is not associated with periparturient changes in follicle-stimulating hormone heterogeneity despite major changes in steroid and luteinizing hormone concentrations. *Biol Reprod.* 1998. Vol. 58. P. 1445–1450.
75. Curtis J. L. *Cattle Embryo Transfer Procedure*. San Diego. 1991. P. 1–131.
76. Cushman R. A., Desouza J. C., Hedgpeth V. S., Britt J. H. Superovulatory response of one ovary is related to the micro- and macroscopic population of follicles in the contralateral ovary of the cow. *Biol Reprod.* 1999. Vol. 60. P. 349–354.
77. Cushman R. A., DeSouza J. C., Hedgpeth V. S., Britt J. H. Effect of long-term treatment with recombinant bovine somatotropin and estradiol on hormone concentrations and ovulatory response of superovulated cattle. *Theriogenology.* 2001. Vol. 55. P. 1533–1547.
78. Cushman R. A., Wood J. R., Slattery R. G., Clopton D. T., Smith J., Beavers K. A., Pohlmeier W. E., Bergman J. W., Moline K. V., Cupp A. S. Reproductive aging influences ovarian function in beef cows. In 2010 Nebraska beef cattle report. Lincoln. 2010. P. 17–18. Available online: <http://digitalcommons.unl.edu/cgi/viewcontent.cgi?article=1554&context=animalscinbcr>. Accessed 15 May 2015.
79. Dayyani N., Karkhudi K., Bakhtiari H. Reproductive performance definition in dairy cattle: affective factors. *International Journal of Advanced Biological and Biomedical Research.* 2013. Vol. 1. P. 1392–1396.
80. Diaz T., Pancarci S. M., Drost M., Schmitt E. J., Ambrose J. D., Fredriksson W. E., Thatcher W. W. Effects of the persistent dominant follicle on the ability of follicle stimulating hormone to induce follicle development and ovulatory responses. *J Dairy Sci.* 2001. Vol. 84. P. 88–99.
81. 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. Vol. 39. P. 25–41.
82. Dieleman S. J., Bevers M. M., Wurth Y. A., Gielen J. T., Willemse A. H. Improved embryo yield and condition of donor ovaries in cows after PMSG superovulation with monoclonal anti-PMSG administered shortly after the preovulatory LH peak. *Theriogenology.* 1989. Vol. 31. P. 473–487.

83. Diskin M. G., Austin E. J., Roche J. F. Exogenous hormonal manipulation of ovarian activity in cattle. *Domest Anim Endocrinol.* 2002. Vol. 23. P. 211–228.
84. Dohmen M. J. W., Lohuis J. A. C. M., Huszenicza G., Nagy P., Gaccs M. The relationship between bacteriological and clinical findings in cows with subcute/chronic endometritis. *Theriogenology.* 1995. Vol. 43. P. 1379–1388.
85. Donaldson L. E. Embryo production in superovulated cows: Transferable embryos correlated with total embryos. *Theriogenology.* 1984. Vol. 21. P. 517–524.
86. Dreyer T. R., Siqueira A. F. P., Magrini T. D., Nichi M., Assumpcao M. E. O. A., Milazzotto M. P., Martinho H. da S. Low-level laser irradiation-induced changes in bovine spermatozoa. 2014. Available online: <http://arxiv.org/abs/1406.5234>. Accessed 25 August 2015.
87. Dreyer T. R., Siqueira A. F. P., Magrini T. D., Fiorito P. A., Assumpcao M. E. O. A., Nichi M., Martinho H. S., Milazotto M. P. Biochemical and topological analysis of bovine sperm cells induced by low power laser irradiation. *Proceedings of SPIE.* 2011. Vol. 8092. Medical laser applications and laser-tissue interactions V.
88. Driancourt M. A. Regulation of ovarian follicular dynamics in farm animals. Implications for manipulation of reproduction. *Theriogenology.* 2001. Vol. 55. P. 1211–1239.
89. Driancourt M. A., Blanc M. R., Mariana J. C. Ovarian activity and hormonal levels of X-irradiated ewes. 1982 (in preparation).
90. Drillich M., Beetz O., Pfutzner A., Sabin M., Sabin H. J., Kutzer P., Nattermann H., Heuwieser W. Evaluation of a systemic antibiotic treatment of toxic puerperal metritis in dairy cows. *J Dairy Sci.* 2001. Vol. 84. P. 2010–2017.
91. Drillich M., Raab D., Wittke M., Heuwieser W. Treatment of chronic endometritis in dairy cows with an intrauterine application of enzymes: A field trial. *Theriogenology.* 2005. Vol. 63. P. 1811–1823.
92. Drillich M., Tesfaye D., Rings F., Schellander K., Heuwieser W., Hoelker M. Effects of polymorphonuclear neutrophile infiltration into the endometrial environment on embryonic development in superovulated cows. *Theriogenology.* 2012. Vol. 77. P. 570–578.
93. Drost M., Brand A., Aarts M. H. A device for nonsurgical recovery of bovine embryos. *Theriogenology.* 1976. Vol. 6. P. 503–507.
94. Durocher J., Morin N., Blondin P. Effect of hormonal stimulation on bovine follicular response and oocyte developmental competence in a commercial operation. *Theriogenology.* 2006. Vol. 65. P. 102–115.

95. Ebner T., Moser M., Tews G. Possible applications of a non-contact 1.48  $\mu\text{m}$  wavelength diode laser in assisted reproduction technologies. *Hum Reprod Update*. 2005. Vol. 11. P. 425–435.
96. Eiler H. Endocrine Glands. In *Dukes' Physiology of Domestic Animals*, 12th Edition. New York. 2004. P. 621–669.
97. Elsdén R. P., Hasler J. F., Seidel G. E. Non-surgical recovery of bovine eggs. *Theriogenology*. 1976. Vol. 6. P. 523–532.
98. Elsdén R. P., Lewis S., Cumming I. A., Lawson R. A. Superovulation in the cow following treatment with PMSG and prostaglandin F $_{2\alpha}$ . *J Reprod Fertil*. 1974. Vol. 36. P. 455–456.
99. Elsdén R. P., Nelson L. D., Seidel G. E. Superovulating cows with follicle stimulating hormone and pregnant mare's serum gonadotrophin. *Theriogenology*. 1978. Vol. 9. P. 17–26.
100. Erickson B. H. Development and senescence of the postnatal bovine ovary. *J Anim Sci*. 1966. Vol. 25. P. 800–805.
101. Favez J. A., McComb J. S., Harper M. A. Comparison of tubal surgery with the CO $_2$  laser and the unipolar microelectrode. *Fertil Steril*. 1983. Vol. 40. P. 476–480.
102. Farin P. W., Moore K., Drost M. Assisted reproductive technologies in cattle. In *Current Therapy in Large Animal Theriogenology*, second edition; Youngquist R. S., Threlfall W. R. Eds.; St. Louis. 2007. P. 496–508.
103. Fernandes C. A. C., Viana J. H. M., Ferreira A. M., Vieira M. R. Follicular population and superovulatory response in cows and heifers. *Theriogenology*. 2002. Vol. 57. P. 606.
104. Findlay J. K., Drummond A. E., Fry R. C. Intraovarian regulation of follicular development and ovulation. *Anim Reprod Sci*. 1996. Vol. 42. P. 321–331.
105. Foldi J., Pecsí A., Szabo J., Pecsí T., Huyghe B., Cox P., Kulcsar M., Huszenicza G. Use of cephalosporins for the treatment of dairy cows suffering of puerperal metritis and endometritis. *Magyar Allatorvosok Lapja*. 2009. Vol. 131. P. 451–455.
106. Fortune J. E., Rivera G. M., Yang M. Y. Follicular development: the role of the follicular microenvironment in selection of the dominant follicle. *Anim Reprod Sci*. 2004. Vol. 82-83. P. 109–126.
107. Fricke P. M. Scanning the future-ultrasonography as a reproductive management tool for dairy cattle. *J Dairy Sci*. 2002. Vol. 85. P. 1918–1926.
108. Fricke P. M., Al-Hassan M. J., Roberts A. J., Reynolds L. P., Redmer D. A., Ford J. J. Effect of gonadotropin treatment on size, number, and cell proliferation of antral follicles in cows. *Domest Anim Endocrinol*. 1997. Vol. 14. P. 171–180.

109. Fujiwara A., Tazawa E., Yasumasu I. Activating effect of light irradiation at various wavelength on the respiration in sperm of the echiuroid, *Urechis unicinctus*, in the presence of carbon monoxide. *J Biochem.* 1991. Vol. 109. P. 486–491.
110. Galvao K. N., Santos N. R., Galvao J. S., Gilbert R. O. Association between endometritis and endometrial cytokine expression in postpartum Holstein cows. *Theriogenology.* 2011. Vol. 76. P. 290–299.
111. Gao X., Chen T., Xing D., Wang F., Pei Y., Wei X. Single cell analysis of PKC activation during proliferation and apoptosis induced by laser irradiation. *J Cell Physiol.* 2006. Vol. 206. P. 441–448.
112. Garcia A., Salaheddine M. Effect of Oestrous Synchronization with Estradiol 17 $\beta$  and Progesterone on Follicular Wave Dynamics in Dairy Heifers. *Reprod Domest Anim.* 2001. Vol. 36. P. 301–307.
113. Garcia Guerra A., Tribulo A., Yapura J., Adams G. P., Singh J., Mapletoft R. J. Lengthened superstimulatory treatment in cattle: Evidence for rescue of follicles within a wave rather than continuous recruitment of new follicles. *Theriogenology.* 2015. Vol. 84. P. 467–476.
114. Garcia Guerra A., Tribulo A., Yapura J., Singh J., Mapletoft R. J. Lengthening the superstimulatory treatment protocol increases ovarian response and number of transferable embryos in beef cows. *Theriogenology.* 2012. Vol. 78. P. 353–360.
115. Garnsworthy P. C., Webb R. The influence of nutrition on fertility in dairy cows. In *Recent Advances in Animal Nutrition*; Garnsworthy P. C., Wiseman J. Eds.; Nottingham. 1999. P. 39–58.
116. Geiges M. L. History of Lasers in Dermatology. *Curr Probl Dermatol.* 2011. Vol. 42. P. 1–6.
117. Genzebu D. A Review of Embryo Transfer Technology in Cattle. *Global Journal of Animal Scientific Research.* 2015. Vol. 3. P. 562–575.
118. Gereš D., Ževrnja B., Žubčić D., Zobel R., Vulic B., Staklarevic N., Gracin K. Asymmetrical functional activities of ovaries and tubular part of reproductive organs of dairy cows. *Veterinarski Arhiv.* 2011. Vol. 81. P. 187–198.
119. Ghamsari S. M., Taguchi K., Abe N., Acorda J. A., Sato M., Yamada H. Evaluation of low level laser therapy on primary healing of experimentally induced full thickness teat wounds in dairy cattle. *Vet Surg.* 1997. Vol. 26. P. 114–120.
120. Gibbons J. R., Wiltbank M. C., Ginther O. J. Relationship between follicular development and the decline in the follicle-stimulating hormone surge in heifers. *Biol Reprod.* 1999. Vol. 60. P. 72–77.

121. Ginther O. J., Knopf L., Kastelic J. P. Temporal associations among ovarian events in cattle during oestrous cycles with two and three follicular waves. *J Reprod Fertil*. 1989. Vol. 87. P. 223–230.
122. Ginther O. J., Wiltbank M. C., Fricke P. M., Gibbons J. R., Kot K. Selection of the dominant follicle in cattle. *Biol Reprod*. 1996. Vol. 55. P. 1187–1194.
123. Giraldo A. M., Hylan D., Bondioli K. R., Godke R. A. Distribution of sexes within the left and right uterine horns of cattle. *Theriogenology*. 2010. Vol. 73. P. 496–500.
124. Glidewell-Kenney C., Hurley L. A., Pfaff L., Weiss J., Levine J. E., Jameson J. L. Nonclassical estrogen receptor alpha signaling mediates negative feedback in the female mouse reproductive axis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007. Vol. 104. P. 8173–8177.
125. Goldman L. Historical perspective: personal reflections. In *Cutaneous Laser Therapy: Principles and Methods*; Arndt K, A., Noe J, M., Rosen S. Eds.; New York. 1983. P. 3–9.
126. Goldman L., Blaney D. J., Kindel D. J., Franke E. K. Effect of the laser beam on the skin. Preliminary report. *J Invest Dermatol*. 1963. Vol. 40. P. 121–122.
127. Gong J. G., Webb R. Control of ovarian follicle development in domestic ruminants: its manipulation to increase ovulation rate and improve reproductive performance. *Animal Breeding Abstracts*. 1996. Vol. 64. P. 195–204.
128. Gonzalez A., Wang H., Carruthers T. D., Murphy B. D., Mapletoft R. J. Increased ovulation rates in PMSG-stimulated beef heifers treated with a monoclonal PMSG antibody. *Theriogenology*. 1994. Vol. 41. P. 1631–1642.
129. Gordon I. *Reproductive Technologies in Farm Animals*. Wallingford. 2004. P. 1–332.
130. Gray B., Stringfellow D., Riddell M., Riddell K., Davenport G., Wright J. The effect of treatment with bovine somatotropin (BST) on the superovulatory response of cattle. *Theriogenology*. 1993. Vol. 39. P. 227.
131. Greve T., Callesen H. Rendez-vous in the oviduct: implications for superovulation and embryo transfer. *Reprod Nutr Dev*. 2001. Vol. 41. P. 451–459.
132. Grizelj J., Vince S., Samardžija M., de Bulnes A. G., Dovenski T., Turmalaj L., Ževrnja B. Use of ultrasonography to detect ovarian response in goats submitted to multiple ovulation and embryo transfer program. *Veterinarski Arhiv*. 2013. Vol. 83. P. 125–134.

133. Guilbault L. A., Grasso F., Lussier J. G., Rouillier P., Matton P. Decreased superovulatory responses in heifers superovulated in the presence of a dominant follicle. *J Reprod Fertil.* 1991. Vol. 91. P. 81–89.
134. Hafez E. S. E., Hafez B. *Reproduction in farm animals*. Seventh edition. USA. 2000.
135. Hafez E. S., Sugie T., Hunt W. L. Superovulation and related phenomena in the beef cow. II. Effect of oestrogen administration on production of ova. *J Reprod Fertil.* 1963. Vol. 5. P. 381–388.
136. Hall J. B., Dee Whittier W., Myers J., Cline M., Cuddy D. GnRH Based Estrus Synchronization Systems for Beef Cows. 2009. Available online: <https://pubs.ext.vt.edu/400/400-013/400-013.html>. Accessed 11 January 2016.
137. Hasler J. F. Current status and potential of embryo transfer and reproductive technology in dairy cattle. *J Dairy Sci.* 1992. Vol. 75. P. 2857–2879.
138. Hasler J. F. Factors influencing the success of embryo transfer in cattle. *Med Vet Quebec.* 2004. Vol. 34. P. 66–67.
139. Hasler J. F. Forty years of embryo transfer in cattle: a review focusing on the journal *Theriogenology*, the growth of the industry in North America, and personal reminiscences. *Theriogenology.* 2014. Vol. 81. P. 152–169.
140. Hasler J. F. The current status and future of commercial embryo transfer in cattle. *Anim Reprod Sci.* 2003. Vol. 79. P. 245–264.
141. Hasler J. F. The Holstein cow in embryo transfer today as compared to 20 years ago. *Theriogenology.* 2006. Vol. 65. P. 4–16.
142. Hasler J. F., McCauley A. D., Lathrop W. F., Foote R. H. Effect of donor-embryo-recipient interactions on pregnancy rate in a large-scale bovine embryo transfer program. *Theriogenology.* 1987. Vol. 27. P. 139–168.
143. Hasler J. F., McCauley A. D., Schermerhorn E. C., Foote R. H. Superovulatory responses of Holstein cows. *Theriogenology.* 1983. Vol. 19. P. 83–99.
144. Heleil B., El Deeb Y. Superovulatory response in relation to follicular dynamics and presence of dominant follicles in Egyptian Buffaloes. *Advances in Biological Research.* 2010. Vol. 4. P. 169–174.
145. Henschel O. Welchen Einfluß hat der Entwicklungsstand des Dominanten Follikels am Rinderovar auf die Entwicklungskompetenz von Eizellen aus dazugehörigen untergeordneten Follikeln? *Innaugural-Dissertation.* Berlin. 2001.
146. Herrler A., Einspanier R., Scharns D., Niemann H. Effect of recombinant bovine somatotropin (rBST) on follicular IGF-I contents and

the ovarian response following superovulatory treatment in dairy cows: a preliminary study. *Theriogenology*. 1994. Vol. 41. P. 601–611.

147. His R. A., Kapatkin A., Strandberg J., Zhu T., Vulcan T., Solonenko M., Rodriguez C., Chang J., Saunders M., Mason N., Hahn S. Photodynamic therapy in the canine prostate using motexafin lutetium. *Clin Cancer Res*. 2001. Vol. 7. P. 651–660.

148. Hylan D., Giraldo A. M., Carter J. A., Gentry G. T., Bondioli K. R., Godke R. A. Sex ratio of bovine embryos and calves originating from the left and right ovaries. *Biol Reprod*. 2009. Vol. 81. P. 933–938.

149. Huang Y. Y., Chen A. C. H., Carroll J. D., Hamblin M. R. Biphasic dose response in low-level light therapy. *Dose Response*. 2009. Vol. 7. P. 358–383.

150. Hussain A. M., Daniel R. C., O'Boyle D. Postpartum uterine flora following normal and abnormal puerperium in cows. *Theriogenology*. 1990. Vol. 34. P. 291–302.

151. Hussein M. M., Abdel Aziz R. L., Abdel-Wahab A., El-Said H. Preliminary study of factors affecting the superovulatory response of high producing dairy cows superstimulated regardless of the stage of estrous cycle in Egypt. *Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Sciences*. 2014. Vol. 3. P. 286–292.

152. Iaffaldano N., Meluzzi A., Manchisi A., Passarella S. Improvement of stored turkey semen quality as a result of He-Ne laser irradiation. *Anim Reprod Sci*. 2005. Vol. 85. P. 317–325.

153. Iaffaldano N., Paventi G., Pizzuto R., Di Iorio M., Bailey J. L., Manchisi A., Passarella S. Helium-neon laser irradiation of cryopreserved ram sperm enhances cytochrome c oxidase activity and ATP levels improving semen quality. *Theriogenology*. 2016 (article in press). Available online: [http://www.theriojournal.com/article/S0093-691X\(16\)00103-5/pdf](http://www.theriojournal.com/article/S0093-691X(16)00103-5/pdf). Accessed 23 May 2016.

154. ICAR (International Committee for Animal Recording) website (<http://www.icar.org/survey/pages/tables.php>). Accessed 14 December 2015.

155. Ilha G. F., Rovani M. T., Gasperin B. G., Ferreira R., de Macedo M. P., Neto O. A., Duggavathi R., Bordignon V., Goncalves P. Regulation of Anti-Mullerian Hormone and Its Receptor Expression around Follicle Deviation in Cattle. *Reprod Domest Anim*. 2016. Vol. 51. P. 188–194.

156. Ilic-Stojanovic O., Ostrachovich E., Nasonov E. L. Low level laser therapy in rheumatoid arthritis patients. possible mechanisms of action in randomised placebo controlled trials. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2008. Vol. 5. Suppl. 1. P. S15.

157. Ingram D. L. Fertility and oocyte numbers after X-irradiation of the ovary. *Journal of Endocrinology*. 1958. Vol. 17. P. 81–90.
158. Ireland J. J., Mihm M., Austin E., Diskin M. G., Roche J. F. Historical perspective of turnover of dominant follicles during the bovine estrous cycle: key concepts, studies, advancements, and terms. *J Dairy Sci*. 2000. Vol. 83. P. 1648–1658.
159. Ireland J. J., Ward F., Jimenez-Krassel F., Ireland J. L., Smith G. W., Lonergan P., Evans A. C. Follicle numbers are highly repeatable within individual animals but are inversely correlated with FSH concentrations and the proportion of good-quality embryos after ovarian stimulation in cattle. *Hum Reprod*. 2007. Vol. 22. P. 1687–1695.
160. Yaakub H., O'Callaghan D., Boland M. P. Effect of type and quantity of concentrates on superovulation and embryo yield in beef heifers. *Theriogenology*. 1999. Vol. 51. P. 1259–1266.
161. Yang M. Y., Rajamahendran R. Involvement of Apoptosis in the Atresia of Nonovulatory Dominant Follicle During the Bovine Estrous Cycle. *Biol Reprod*. 2000. Vol. 63. P. 1313–1321.
162. Yao G., Yin M., Lian J., Tian H., Liu L., Li X., Sun F. MicroRNA-224 is involved in transforming growth factor-beta-mediated mouse granulosa cell proliferation and granulosa cell function by targeting Smad4. *Mol Endocrinol*. 2010. Vol. 24. P. 540–551.
163. Yavas Y., Walton J. S. Postpartum acyclicity in suckled beef cows: a review. *Theriogenology* 2000. Vol. 54. P. 25–55.
164. Yazdi S. R., Bakhshi S., Jannat A. F., Akhoond M. R., Ansary A. Effect of 830 nm diode laser irradiation on human sperm motility. *Int J Fertil Steril*. 2010. Vol. 4. Suppl. 1. P. 68.
165. Yokoo M., Sato E. Cumulus-oocyte complex interactions during oocyte maturation. *Int Rev Cytol*. 2004. Vol. 235. P. 251–291.
166. Jacobs T. M., Rosen G. M. Photodynamic therapy as a treatment for esophageal squamous cell carcinoma in a dog. *J Am Anim Hosp Assoc*. 2000. Vol. 36. P. 257–261.
167. Jaiswal R. S., Singh J., Adams G. P. Developmental pattern of small antral follicles in the bovine ovary. *Biol Reprod*. 2004. Vol. 71. P. 1244–1251.
168. Jako G. J. Laser surgery of the vocal cords. An experimental study with carbon dioxide lasers on dogs. *Laryngoscope*. 1972. Vol. 82. P. 2204–2216.
169. Jankun J., Lilge L., Douplik A., Keck R. W., Pestka M., Szkudlarek M., Stevens P. J., Lee R. J., Selman S. H. Optical characteristics of the canine prostate at 665 nm sensitized with tin etiopurpurin dichloride: need

for real time monitoring of photodynamic therapy. *J Urol*. 2004. Vol. 172. P. 739–743.

170. Juozaitienė V., Kerzienė S. *Biometrija ir kompiuterinė duomenų analizė*. Kaunas. 2001. P. 115.

171. Kaczmarowski M., Malinowski E., Markiewicz H. Influence of various treatment methods on bacteriological findings in cows with puerperal endometritis. *Pol J Vet Sci*. 2004. Vol. 7. P. 171–174.

172. Kadakia R., Arraztoa J. A., Bondy C., Zhou J. Granulosa cell proliferation is impaired in the Igf1 null ovary. *Growth Horm IGF Res*. 2001. Vol. 11. P. 220–224.

173. Kafi M., McGowan M. R. Factors associated with variation in the superovulatory response of cattle. *Anim Reprod Sci*. 1997. Vol. 48. P. 137–157.

174. Kayacik V., Salmanoglu M. R., Polat B., Ozluer A. Evaluation of the corpus luteum size throughout the cycle by ultrasonography and progesterone assay in cows. *Turk J Vet Anim Sci*. 2005. Vol. 29. P. 1311–1316.

175. Kakar S. S., Rahe C. H., Neill J. D. Molecular cloning, sequencing, and characterizing the bovine receptor for gonadotropin releasing hormone (GnRH). *Domest Anim Endocrinol*. 1993. Vol. 10. P. 335–342.

176. Kanitz W., Becker F., Schneider F., Kanitz E., Leiding C., Nohner H. P., Pohland R. Superovulation in cattle: practical aspects of gonadotropin treatment and insemination. *Reprod Nutr Dev*. 2002. Vol. 42. P. 587–599.

177. Karu T. I., Pyatibrat L. V., Kolyakov S. F., Afanasyeva N. I. Absorption measurements of a cell monolayer relevant to phototherapy: Reduction of cytochrome c oxidase under near IR radiation. *J Photochem Photobiol B*. 2005. Vol. 81. P. 98–106.

178. Karu T. Mitochondrial mechanisms of photobiomodulation in context of new data about multiple roles of ATP. *Photomed Laser Surg*. 2010. Vol. 28. P. 159–160.

179. Karu T. Photobiology of low power laser effects. *Health Phys*. 1989. Vol. 56. P. 691–704.

180. Katz E., Ricciarelli E., Adashi E. Y. The potential relevance of growth hormone to female reproductive physiology and pathophysiology. *Fertil Steril*. 1993. Vol. 59. P. 8–34.

181. Kawamata M. Relationships between the number of small follicles prior to superovulatory treatment and superovulatory response in Holstein cows. *J Vet Med Sci*. 1994. Vol. 56. P. 965–967.

182. Keller D. S., Teepker G. Effect of variability in response to superovulation on donor cow selection differentials in nucleus breeding schemes. *J Dairy Sci*. 1990. Vol. 73. P. 549–554.

183. Killian G. J. Evidence for the role of oviduct secretions in sperm function, fertilization and embryo development. *Anim Reprod Sci.* 2004. Vol. 82-83. P. 141–153.
184. Kim I. H., Son D. S., Yeon S. H., Choi S. H., Park S. B., Ryu I. S., Suh G. H., Lee D. W., Lee C.S., Lee H. J., Yoon J. T. Effect of dominant follicle removal before superstimulation on follicular growth, ovulation and embryo production in Holstein cows. *Theriogenology.* 2001. Vol. 55. P. 937–945.
185. Kohram H., Twagiramungu H., Bousquet D., Durocher J., Guilbault L. A. Ovarian superstimulation after follicular wave synchronization with GnRH at two different stages of the estrous cycle in cattle. *Theriogenology.* 1998. Vol. 49. P. 1175–1186.
186. Kristula M., Smith B. I., Simeone A. The use of daily postpartum rectal temperature to select dairy cows for treatment with systemic antibiotics. *The Bovine Practitioner.* 2001. Vol. 35. P. 117–125.
187. Kudlač E., Konečný J., Čermak J. Progesterone concentrations in milk of superovulated cows. *Acta Veterinaria Brno.* 1991. Vol. 60. P. 171–179.
188. Kuhn M. T., VanRaden P. M., Hutchison J. L. Use of early lactation days open records for genetic evaluation of cow fertility. *J Dairy Sci.* 2004. Vol. 87. P. 2277–2284.
189. Kuntze A., Aurich J. Der Endometritis-Pyometra Komplex bei Grosstieren. Jena. 1995.
190. L'Eplattenier H. F., Klem B., Teske E., van Sluijs F. J., van Nimwegen S. A., Kirpensteijn J. Preliminary results of intraoperative photodynamic therapy with 5-aminolevulinic acid in dogs with prostate carcinoma. *Vet J.* 2008. Vol. 178. P. 202–207.
191. Lafri M., Ponsart C., Nibart M., Durand M., Morel A., Jeanguyot N., Badinand F., De Mari K., Humblot P. Influence of CIDR treatment during superovulation on embryo production and hormonal patterns in cattle. *Theriogenology.* 2002. Vol. 58. P. 1141–1151.
192. Lamb G. C., Brown D. R., Wasson R. C., Larson J. E., Dahlen C. R., DiCostanzo A. Effect of trace mineral nutrition on follicular response, ovulation, and embryo production in superovulated angus heifers. *Reprod Fertil Dev.* 2004. Vol. 16. P. 289.
193. Lane E. A., Austin E. J., Crowe M. A. Oestrus synchronisation in cattle. Current options following the EU regulations restricting use of oestrogenic compounds in food-producing animals: a review. *Anim Reprod Sci.* 2008. Vol. 109. P. 1–16.
194. Laster D. B. Disappearance of and uptake of <sup>125</sup>I FSH in the rat, rabbit, ewe and cow. *J Reprod Fertil.* 1972. Vol. 30. P. 407–415.

195. LeBlanc S. J. Postpartum uterine disease and dairy herd reproductive performance: A review. *Vet J.* 2008. Vol. 176. P. 102–114.
196. LeBlanc S. J., Duffield T. F., Leslie K. E., Bateman K. G., Keefe G. P., Walton J. S., Johnson W. H. The effect of treatment of clinical endometritis on reproductive performance in dairy cows. *J Dairy Sci.* 2002. Vol. 85. P. 2237–2249.
197. Lerner S. P., Thayne W. V., Baker R. D., Henschen T., Meredith S., Inskeep E. K., Dailey R. A., Lewis P. E., Butcher R. L. Age, dose of FSH and other factors affecting superovulation in Holstein cows. *J Anim Sci.* 1986. Vol. 63. P. 176–183.
198. Leroy J. L. M. R., Sturmey R. G., Van Hoeck V., De Bie J., McKeegan P. J., Bols P. E. J. Dietary fat supplementation and the consequences for oocyte and embryo quality: hype or significant benefit for dairy cow reproduction? *Reprod Domest Anim.* 2014. Vol. 49. P. 353–361.
199. Leroy J. L. M. R., Van Soom A., Opsomer G., Goovaerts I. G. F., Bols P. E. J. Reduced fertility in high-yielding dairy cows: are the oocyte and embryo in danger? Part II. Mechanisms linking nutrition and reduced oocyte and embryo quality in high-yielding dairy cows. *Reprod Domest Anim.* 2008. Vol. 43. P. 623–632.
200. Lewis G. S. Steroidal regulation of uterine resistance to bacterial infection in livestock. *Reprod Biol Endocrinol.* 2003. Vol. 1. P. 117.
201. Liboriussen T. Genetic variation in response to superovulation in cattle. In *Proceedings of the 5th World Congress on Genetics Applied to Livestock Production*. Guelph. 1994. Vol. 19. P. 234–236.
202. Lindner G. M., Wright R. W. Bovine embryo morphology and evaluation. *Theriogenology.* 1983. Vol. 20. P. 407–416.
203. Looney C. R. Superovulation in beef females. In *Proceedings of 5th Annual Convention of AETA*. Fort Worth, Texas. 1986. P. 16–29.
204. Looney C. R., Boutte B. W., Archbald L. F., Godke R. A. Comparison of once daily and twice daily FSH injections for superovulating beef cattle. *Theriogenology.* 1981. Vol. 15. P. 13–22.
205. Lopez-Gatius F. Side of gestation in dairy heifers affects subsequent sperm transport and pregnancy rates after deep insemination into one uterine horn. *Theriogenology.* 1996. Vol. 45. P. 417–425.
206. Lopez-Gatius F. Transuterine sperm transport is not affected by bilateral asymmetry of the reproductive system in dairy cows. *Theriogenology.* 1997. Vol. 47. P. 1319–1325.
207. Lovie M., García A., Hackett A., Mapletoft R. J. The effect of dose schedule and route of administration on superovulatory response to Folltropin in Holstein cows. *Theriogenology.* 1994. Vol. 41. P. 241.

208. Lucroy M. D., Bowles M. H., Higbee R. G., Blaik M. A., Ritchey J. W., Ridgway T. D. Photodynamic therapy for prostatic carcinoma in a dog. *J Vet Intern Med.* 2003. Vol. 17. P. 235–237.
209. Lucroy M. D., Edwards B. F., Madewell B. R. Veterinary photodynamic therapy. *J Am Vet Med Assoc.* 2000. Vol. 216. P. 1745–1751.
210. Macchi M. M., Bruce J. N. Human pineal physiology and functional significance of melatonin. *Front Neuroendocrinol.* 2004. Vol. 25. P. 177–195.
211. Machaty Z., Peippo J., Peter A. Production and manipulation of bovine embryos: techniques and terminology. *Theriogenology.* 2012. Vol. 78. P. 937–950.
212. Maciel M., Gustafsson H., Rodriguez-Martinez H. Superovulatory response in lactating cows with different follicular dynamics. *J Vet Med A.* 1995. Vol. 42. P. 123–129.
213. Magoffin D. A. Ovarian theca cell. *Int J Biochem Cell Biol.* 2005. Vol. 37. P. 1344–1349.
214. Manes J., Aller J. F., Callejas S. S., Hozbor F., Alberio R. H. Influence of the length of progestagen treatment and the time of oestradiol benzoate application on the ovulatory follicle size and ovulation time in anoestrous and cyclic beef cows. *Reprod Domest Anim.* 2012. Vol. 47. P. 412–418.
215. Mapletoft R. J. Bovine embryo transfer. In *IVIS Reviews in Veterinary Medicine.* Ithaca. 2006. Available online: [http://uesc.br/cursos/pos\\_graduacao/mestrado/animal/bibliografia2012/paola\\_artigo6\\_bovine.pdf](http://uesc.br/cursos/pos_graduacao/mestrado/animal/bibliografia2012/paola_artigo6_bovine.pdf). Accessed 15 January 2016.
216. Mapletoft R. J. Embryo transfer in the cow: general procedures. *Rev Sci Tech.* 1985. Vol. 4. P. 843–858.
217. Mapletoft R. J. History and perspectives on bovine embryo transfer. *Anim Reprod.* 2013. Vol. 10. P. 168–173.
218. Mapletoft R. J., Bo G. A. Innovative strategies for superovulation in cattle. *Anim Reprod.* 2013. Vol. 10. P. 174–179.
219. Mapletoft R. J., Bo G. A. The evolution of improved and simplified superovulation protocols in cattle. *Reprod Fertil Dev.* 2012. Vol. 24. P. 278–283.
220. Mapletoft R. J., Bo G. A., Baruselli P. S. Control of ovarian function for assisted reproductive technologies in cattle. *Anim Reprod.* 2009. Vol. 6. P. 114–124.
221. Mapletoft R. J., Hasler J. F. Assisted reproductive technologies in cattle: a review. *Rev Sci Tech.* 2005. Vol. 24. P. 393–403.

222. Mapletoft R. J., Steward K. B., Adams G. P. Recent advances in the superovulation in cattle. *Reprod Nutr Dev.* 2002. Vol. 42. P. 601–611.
223. Martinez-Pastor F., Aisen E., Fernandez-Santos M. R., Estes M. C., Maroto-Morales A., Garcia-Alvarez O., Garde J. J. Reactive oxygen species generators affect quality parameters and apoptosis markers differently in red deer spermatozoa. *Reproduction.* 2009. Vol. 137. P. 225–235.
224. Masiulis M., Žilinskas H., Šiugždaitė J., Riškevičienė V. Mikrobiologinis karvių lochijų tyrimas. *Veterinarija ir zootechnika.* 2003. T. 21, P. 25–28.
225. McCaw D. L., Pope E. R., Payne J. T., West M. K., Tompson R. V., Tate D. Treatment of canine oral squamous cell carcinomas with photodynamic therapy. *Br J Cancer.* 2000. Vol. 82. P. 1297–1299.
226. McGowan M. R., Braithwaite M., Jochle W., Mapletoft R. J. Superovulation of beef heifers with Pergonal (HMG): A dose response trial. *Theriogenology.* 1985. Vol. 24. P. 173–184.
227. McNatty K. P., Juengel J. L., Pitman J. L. Oocyte-somatic cell interactions and ovulation rate: effects on oocyte quality and embryo yield. *Reproductive Biology Insights.* 2014. Vol. 7. P. 1–8.
228. Menchaca A., Pinczak A., Rubianes E. Follicular recruitment and ovulatory response to FSH treatment initiated on day 0 or day 3 postovulation in goats. *Theriogenology.* 2002. Vol. 58. P. 1713–1721.
229. Mester E., Gyenes C., Tota J. C. Untersuchungen über die Wirkung von Laserstrahlen auf die Wundheilung. *Z Esper Chirurgie.* 1969. Vol. 2. P. 94–101.
230. Mester E., Szende B., Gartner P. The effect of laser beams on the growth of hair in mice. *Radiobiol Radiother.* 1968. Vol. 9. P. 621–626.
231. Mikel Jensen A., Greve T., Madej A., Edqvist L. E. Endocrine profiles and embryo quality in the PMSG-PGF2 $\alpha$  treated cow. *Theriogenology.* 1982. Vol. 18. P. 33–44.
232. Misra A. K., Kasiraj R., Mutha Rao M., Ranga Reddy N. S., Joshi B. V. Embryo transfer in buffalo in India. In *Proceedings 4th World Buffalo Congress.* Sao Paulo. 1994. Vol. 3. P. 501–504.
233. Moenter S. M., Brand R. C., Karsch F. J. Dynamics of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) secretion during the GnRH surge: insights into the mechanism of GnRH surge induction. *Endocrinology.* 1992. Vol. 130. P. 2978–2984.
234. Monniaux D., Chupin D., Saumande J. Superovulatory responses of cattle. *Theriogenology.* 1983. Vol. 19. P. 55–81.

235. Monniaux D., Mariana J. C., Gibson W. R. Action of PMSG on follicular populations in the heifer. *J Reprod Fertil.* 1984. Vol. 70. P. 243–253.
236. Moor R. M., Kruip T. A. M., Green D. Intraovarian control of folliculogenesis: Limits to superovulation? *Theriogenology.* 1984. Vol. 21. P. 103–116.
237. Moreno Millan H., Ocana-Quero J. H. Preliminary results of the evaluation of the use of clinical laser He-Ne radiation in the process of bovine “in vitro fertilization“. *Bulletin UASVM, Veterinary Medicine.* 2009. Vol. 66. P. 495.
238. Murphy B. D., Martinuk S. D. Equine chorionic gonadotropin. *Endocr Rev.* 1991. Vol. 12. P. 27–44.
239. Mutha Rao M., Umamahesh Y., Misra A. K. Evaluation of ovarian response and embryo production pattern in ongole cows. *The Indian Journal of Animal Sciences.* 2010. Vol. 80. P. 973–975.
240. Nasser L. F., Adams G. P., Bo G. A., Mapletoft R. J. Ovarian superstimulatory response relative to follicular wave emergence in heifers. *Theriogenology.* 1993. Vol. 40. P. 713–724.
241. Nasser L. F., Sa Filho M. F., Reis E. L., Rezende C. R., Mapletoft R. J., Bo G. A., Baruselli P. S. Exogenous progesterone enhances ova and embryo quality following superstimulation of the first follicular wave in Nelore (*Bos indicus*) donors. *Theriogenology.* 2011. Vol. 76. P. 320–327.
242. Nett T. M., Cermak D., Braden T., Manns J., Niswender G. Pituitary receptors for GnRH and estradiol, and pituitary content of gonadotropins in beef cows. I. Changes during the estrous cycle. *Domest Anim Endocrinol.* 1987. Vol. 4. P. 123–132.
243. Noakes D. E., Wallace L., Smith G. R. Bacterial flora of the uterus of cows after calving on two hygienically contrasting farms. *Vet Rec.* 1991. Vol. 128. P. 440–442.
244. Nores H., Gerlach K., Schneider J. The effect of soft laser treatment on wound healing in cattle. In *Veterinary Wound Healing Association 5th Congress.* Hannover. 2001.
245. Novoselova E. G., Glushkova O. V., Cherenkov D. A., Chudnovsky V. M., Fesenko E. E. Effects of low-power laser radiation on mice immunity. *Photodermatol Photoimmunol Photomed.* 2006. Vol. 22. P. 33–38.
246. O’Callaghan D., Yaakub H., Hyttel P., Spicer L. J., Boland M. P. Effect of nutrition and superovulation on oocyte morphology, follicular fluid composition and systemic hormone concentrations in ewes. *J Reprod Fertil.* 2000. Vol. 118. P. 303–313.

247. O'Connor M. New concepts in follicular development in cattle. 1993.
248. Ocana-Quero J. M., Gomez-Villamandos R. J., Moreno-Millan M., Santisteban-Valenzuela J. M. Biological effects of helium–neon (He–Ne) laser irradiation on acrosome reaction in bull sperm cells. *J Photochem Photobiol B*. 1997. Vol. 40. P. 294–298.
249. Ocana-Quero J. M., Gomez-Villamandos R., Moreno-Millan M., Santisteban-Valenzuela J. M. Detrimental effect of the low power helium–neon laser irradiation on in vitro meiotic maturation of immature bovine oocytes. *Lasers in the Life Sciences*. 1997. Vol. 7. P. 157–166.
250. Ocana-Quero J. M., Gomez-Villamandos R., Moreno-Millan M., Santisteban-Valenzuela J. M. Helium–neon (He–Ne) laser irradiation increases the incidence of unreduced bovine oocytes during the first meiotic division in vitro. *Lasers Med Sci*. 1998. Vol. 13. P. 260–264.
251. Ogata M. Clinical applications of laser therapy in dogs and cats. *Journal of Veterinary Medicine*. 1990. Vol. 43. P. 239–242.
252. Otoi T., Koyama N., Yamamoto K., Tachikawa S., Suzuki T. Effect of removal of large follicles after artificial insemination on embryo yield of superovulated beef cows. *Can J Vet Anim Sci*. 2000. Vol. 80. P. 199–201.
253. Otter T. Pregnancy rate of fresh and frozen-thawed cattle embryos. In *Proceedings of the 10th Scientific Meeting of the AETE*. Lyon. 1994. P. 228.
254. Palenik T., Dolezel R., Kratochvil J., Cech S., Zajic J., Jan Z., Vyskocil M. Evaluation of rectal temperature in diagnosis of puerperal metritis in dairy cows. *Veterinarni Medicina*. 2009. Vol. 54. P. 149–155.
255. Panjehpour M., DeNovo R. C., Petersen M. G., Overholt B. F., Bower R., Rubinchik V., Kelly B. Photodynamic therapy using Verteporfin (benzoporphyrin derivative monoacid ring A, BPD-MA) and 630 nm laser light in canine esophagus. *Lasers Surg Med*. 2002. Vol. 30. P. 26–30.
256. Passarella S., Casamassima E., Molinari S., Pastore D., Quagliariello E., Catalano I. M., Cingolani A. Increase of proton electrochemical potential and ATP synthesis in rat liver mitochondria irradiated in vitro by helium–neon laser. *FEBS Letters*. 1984. Vol. 175. P. 95–99.
257. Patel R. K., Roy A. Comparative Evaluation of the effect of various Lectins on short term lymphocyte culture in cattle and buffalo. *Journal of Bio Innovation*. 2013. Vol. 2. P. 1–4.
258. Perry G. 2012 statistics of embryo collection and transfer in domestic farm animals. 2013. Available online: [http://www.iets.org/pdf/comm\\_data/december2013.pdf](http://www.iets.org/pdf/comm_data/december2013.pdf). Accessed 24 November 2015.

259. Perry G. 2013 statistics of embryo collection and transfer in domestic farm animals. 2014. Available online: [http://www.iets.org/pdf/comm\\_data/December2014.pdf](http://www.iets.org/pdf/comm_data/December2014.pdf). Accessed 24 November 2015.
260. Peters H., Levy E. Radiation sensitivity of the mouse ovary: fertility and oocyte survival. *Fertil Steril*. 1964. Vol 15. P. 407–418.
261. Petit T., Spengler J., Rosengarten R., Aurich J. Prevalance of potentially pathogenic bacteria as genital pathogens in dairy cattle. *Reprod Domest Anim*. 2009. Vol. 44. P. 88–91.
262. Phillipppo M., Rowson L. E. A. Prostaglandins and superovulation in the bovine. *Annales de Biologie Animale, Biochimie, Biophysique*. 1975. Vol. 15. P. 233–240.
263. Pierson R. A., Ginther O. J. Follicular populations during the estrous cycle in heifers. II. Influence of right and left sides and intraovarian effect of the corpus luteum. *Anim Reprod Sci*. 1987. Vol. 14. P. 177–186.
264. Pierson R. A., Ginther O. J. Ultrasonic imaging of the ovaries and uterus in cattle. *Theriogenology*. 1988. Vol. 29. P. 21–37.
265. Poyton R. O., Ball K. A. Therapeutic photobiomodulation: nitric oxide and a novel function of mitochondrial cytochrome c oxidase. *Discovery Medicine*. 2011. Vol. 11(57). P. 154–159.
266. Potok M. E., Nix D. A., Parnell T. J., Cairns B. R. Reprogramming the maternal zebrafish genome after fertilization to match the paternal methylation pattern. *Cell*. 2013. Vol. 153. P. 759–772.
267. Putney D. J., Drost M., Thatcher W. W. Embryonic development in superovulated dairy cattle exposed to elevated ambient temperatures between Days 1 to 7 post insemination. *Theriogenology*. 1988. Vol. 30. P. 195–209.
268. Rasby R., Deutscher G. Synchronizing Estrus in Beef Cattle. 2000. Available online: <http://beef.unl.edu/learning/estrussynch.shtml>. Accessed 10 February 2016.
269. Regaud C., Lacassagne A. Sur les processus de la degenerescence des follicules dans les ovaires rontgenises de la lapine. *Comptes Rendus Hebdomadaires des Seances et Memoires de la Societe de Biologie*. 1913. Vol. 74. P. 869–871.
270. Roche J. F., Crowe M. A., Boland M. P. Postpartum anoestrus in dairy and beef cows. *Anim Reprod Sci*. 1992. Vol. 28. P. 371–378.
271. Romero A., Albert J., Brink Z., Seider. G. E. Numbers of small follicles in ovaries affect superovulation response in cattle. *Theriogenology*. 1991. Vol. 35. P. 265.

272. Rothschild M. F., Plastow G. S. Applications of genomics to improve livestock in the developing world. *Livestock Science*. 2014. Vol. 166. P. 76–83.
273. Rowe R. F., Del Campo M. R., Critser J. K., Ginther O. J. Embryo transfer in cattle: nonsurgical transfer. *Am J Vet Res*. 1980. Vol. 41. P. 1024–1028.
274. Rowe R. F., Del Campo M. R., Eilts C. L., French L. R., Winch R. P., Ginther O. J. A single cannula technique for nonsurgical collection of ova from cattle. *Theriogenology*. 1976. Vol. 6. P. 471–483.
275. Sa Filho M. F., Ayres H., Ferreira R. M., Marques M. O., Reis E. L., Silva R. C., Rodrigues C. A., Madureira E. H., Bo G. A., Baruselli P. S. Equine chorionic gonadotropin and gonadotropin-releasing hormone enhance fertility in a norgestomet-based, timed artificial insemination protocol in suckled Nelore (*Bos indicus*) cows. *Theriogenology*. 2010. Vol. 73. P. 651–658.
276. Sartori R., Fricke P. M., Ferreira J. C., Ginther O. J., Wiltbank M. C. Follicular deviation and acquisition of ovulatory capacity in bovine follicles. *Biol Reprod*. 2001. Vol. 65. P. 1403–1409.
277. Sato T., Nakada K., Uchiyama Y., Kimura Y., Fujiwara N., Sato Y., Umeda M., Furukawa T. The effect of pretreatment with different doses of GnRH to synchronize follicular wave on superstimulation of follicular growth in dairy cattle. *J Reprod Dev*. 2005. Vol. 51. P. 573–578.
278. Saumande J. Concentrations of luteinizing hormone, oestradiol-17 $\beta$  and progesterone in the plasma of heifers treated to induce superovulation. *Journal of Endocrinology*. 1980. Vol. 84. P. 425–437.
279. Saumande J., Chupin D. Induction of superovulation in cyclic heifers: The inhibitory effect of large doses of PMSG. *Theriogenology*. 1986. Vol. 25. P. 233–247.
280. Saumande J., Chupin D., Mariana J. C., Ortavant R., Mauleon P. Factors affecting the variability of ovulation rates after PMSG stimulation. In *Control of reproduction in the cow*; Sreenan J. M. Ed.; The Hague. 1978. P. 195–224.
281. Savio J. D., Keenan L., Boland M. P., Roche J. F. Pattern of growth of dominant follicles during the oestrous cycle of heifers. *J Reprod Fertil*. 1988. Vol. 83. P. 663–671.
282. Schams D., Berisha B., Kosmann M., Amselgruber W. M. Expression and localization of IGF family members in bovine antral follicles during final growth and in luteal tissue during different stages of estrous cycle and pregnancy. *Domest Anim Endocrinol*. 2002. Vol. 22. P. 51–72.

283. Schams D., Menzer C., Schallenberger E., Hoffman B., Hahn J., Hahn R. Some studies on pregnant mare serum gonadotrophin (PMSG) and on endocrine responses after application for superovulation in cattle. In *Control of reproduction in the cow*; Sreenan J. M. Ed.; The Hague. 1978. P. 122–143.
284. Schmidt M. H., Reichert K. W., Ozker K., Meyer G. A., Donohoe D. L., Bajic D. M., Whelan N. T., Whelan H. T. Preclinical evaluation of benzoporphyrin derivative combined with a light-emitting diode array for photodynamic therapy of brain tumors. *Pediatr Neurosurg*. 1999. Vol. 30. P. 225–231.
285. Schubert C. Durch GnRH und FSH induzierte Hormonprofile im gestörten Puerperium beim Rind. Inaugural-Dissertation. Leipzig. 1997. P. 9–11.
286. Seidel G. E., Elsdon R. P., Hasler J. F. Embryo Transfer in Dairy Cattle. Fort Atkinson. 2003. P. 1–96.
287. Selk G. Embryo Transfer in Cattle. Oklahoma cooperative extension service. 2013. P. ANSI-358-1–ANSI-358-4. Available online: [http://www.thejudgingconnection.com/pdfs/Embryo\\_Transfer.pdf](http://www.thejudgingconnection.com/pdfs/Embryo_Transfer.pdf). Accessed 21 September 2015.
288. Shanyfelt L. M., Dickrell P. L., Edelhauser H. F., Hahn D. W. Effects of laser repetition rate on corneal tissue ablation for 193-nm excimer laser light. *Lasers Surg Med*. 2008. Vol. 40. P. 483–493.
289. Shaw D. W., Good T. E. Recovery rates and embryo quality following dominant follicle ablation in superovulated cattle. *Theriogenology*. 2000. Vol. 53. P. 1521–1528.
290. Sheldon I. M., Dobson H. Postpartum uterine health in cattle. *Anim Reprod Sci*. 2004. Vol. 82. P. 295–306.
291. Sheldon I. M., Lewis G. S., LeBlanc S., Gilbert R. O. Defining postpartum uterine disease in cattle. *Theriogenology*. 2006. Vol. 65. P. 1516–1530.
292. Sheldon I. M., Williams E. J., Miller A. N., Nash D. M., Herath S. Uterine diseases in cattle after parturition. *Vet J*. 2008. Vol. 176. P. 115–121.
293. Short R. E., Bellows R. A., Staigmiller R. B., Berardinelli J. G., Custer E. E. Physiological mechanisms controlling anestrus and infertility in postpartum beef cattle. *J Anim Sci*. 1990. Vol. 68. P. 799–816.
294. Shu B., Wu Z., Hao L., Zeng D., Feng G., Lin Y. Experimental study on He-Ne laser irradiation to inhibit scar fibroblast growth in culture. *Chin J Traumatol*. 2002. Vol. 5. P. 246–249.
295. Silva P. F. N., Gadella B. M. Detection of damage in mammalian sperm cells. *Theriogenology*. 2006. Vol. 65. P. 958–978.

296. Silva-Santos K. C., Marinho L. S. R., Santos G. M. G., Machado F. Z., Gonzalez S. M., Lisboa L. A., Seneda M. M. Ovarian follicle reserve: emerging concepts and applications. *Anim Reprod.* 2013. Vol. 10. P. 180–186.
297. Simunovic Z., Ivankovich A. D., Depolo A. Wound healing of animal and human body sport and traffic accident injuries using low-level laser therapy treatment: a randomized clinical study of seventy-four patients with control group. *J Clin Laser Med Surg.* 2000. Vol. 18. P. 67–73.
298. Singh J., Dominguez M., Jaiswal R., Adams G. P. A simple ultrasound test to predict the superstimulatory response in cattle. *Theriogenology.* 2004. Vol. 62. P. 227–243.
299. Sirard M. A., Richard F., Blondin P., Robert C. Contribution of the oocyte to embryo quality. *Theriogenology.* 2006. Vol. 65. P. 126–136.
300. Smith J. T., Dungan H. M., Stoll E. A., Gottsch M. L., Braun R.E., Eacker S. M., Clifton D. K., Steiner R. A. Differential regulation of KiSS-1 mRNA expression by sex steroids in the brain of the male mouse. *Endocrinology.* 2005. Vol. 146. P. 2976–2984.
301. Soares C. A., Annes K., Dreyer T. R., Magrini T., Sonoda M. T., Martinho H., Nichi M., Assumpcao M. E. O., Milazzotto M. P. Photobiological effect of low-level laser irradiation in bovine embryo production system. *J Biomed Opt.* 2014. Vol. 19. P. 035006-9.
302. Son D. S., Choe C. Y., Choi S. H., Sang R. C., Kim H. J., Han M. H., Ryu I. S., Suh G. H., Kim U. H., Kim I. H. Effect of estradiol benzoate or GnRH treatment prior to superstimulation in CIDR-treated, Korean native cows (*Bos taurus*). *Anim Reprod Sci.* 2007. Vol. 100. P. 14–21.
303. Spicer L. J., Geisert R. D. Concentrations of insulin-like growth factor-I, estradiol and progesterone in follicular fluid of ovarian follicles during early pregnancy in cattle. *Theriogenology.* 1992. Vol. 37. P. 749–760.
304. Stell A. J., Dobson J. M., Langmack K. Photodynamic therapy of feline superficial squamous cell carcinoma using topical 5-aminolaevulinic acid. *J Small Anim Pract.* 2001. Vol. 42. P. 164–169.
305. Stevenson J. S. Reproductive Management of Dairy Cows in High Milk – Producing Herds. *J Dairy Sci.* 2001. Vol. 84. P. E128–E143.
306. Stoebe D. P., Moberg G. P. Repeated acute stress during the follicular phase and luteinizing hormone surge of dairy heifers. *J Dairy Sci.* 1982. Vol. 65. P. 92–96.
307. Stroebech L., Mazzoni G., Pedersen H. S., Freude K. K., Kadarmideen H. N., Callesen H., Hyttel P. In vitro production of bovine embryos: revisiting oocyte development and application of systems biology. *Anim Reprod.* 2015. Vol. 12. P. 465–472.

308. Stronge A. J. H., Sreenan J. M., Diskin M. G., Mee J. F., Kenny D. A., Morris D. G. Post-insemination milk progesterone concentration and embryo survival in dairy cows. *Theriogenology*. 2005. Vol. 64. P. 1212–1224.
309. Stroud B. The year 2011 worldwide statistics of embryo transfer in domestic farm animals. *Embryo Transfer Newsletter*. 2012. Vol. 30. P. 16–26.
310. Stroud B., Hasler J. F. Dissecting why superovulation and embryo transfer usually work on some farms but not on others. *Theriogenology*. 2006. Vol. 65. P. 65–76.
311. Sutherland I. W. Alginates. In *Biomaterials: Novel Materials from Biological Sources*; Byrom D. Ed.; New York. 1991. P. 307–333.
312. Špakauskas V., Klimienė I., Šakys P. Linkomicino ir kolistino derinio efektyvumo ir toksiškumo tyrimai gydant endometritu sergančias karves ir kiaules. *Žemės ūkio mokslai*. 2005. Nr. 1. P. 77–82.
313. Tanabe S., Yamaguchi M., Iijima M., Nakajima S., Sakata I., Miyaki S., Takemura T., Furuoka H., Kobayashi Y., Matsui T., Uzuka Y., Sarashina T. Fluorescence detection of a new photosensitizer, PAD-S31, in tumour tissues and its use as a photodynamic treatment for skin tumours in dogs and a cat: a preliminary report. *The Veterinary Journal*. 2004. Vol. 167. P. 286–293.
314. Tate L. P., Newman H. C., Cullen J. M., Sweeney C. Neodymium (Nd): YAG laser surgery in the equine larynx: a pilot study. *Lasers Surg Med*. 1986. Vol. 6. P. 473–476.
315. Thibier M. Data Retrieval Committee Statistics of Embryo Transfer-Year 2007. The worldwide activity in farm animals embryo transfer. *Embryo Transfer Newsletter*. 2008. Vol. 26. P. 4–9.
316. Tonhati H., Lobo R. B., Oliveira H. N. Repeatability and heritability of response to superovulation in Holstein cows. *Theriogenology*. 1999. Vol. 51. P. 1151–1156.
317. Tribulo A., Rogan D., Tribulo H., Tribulo R., Alasino R. V., Baltrano D., Bianco I., Mapletoft R. J., Bo G. A. Superstimulation of ovarian follicular development in beef cattle with a single intramuscular injection of Folltropin-V. *Anim Reprod Sci*. 2011. Vol. 129. P. 7–13.
318. Tribulo A., Rogan D., Tribulo H., Tribulo R., Mapletoft R. J., Bo G. A. Superovulation of beef cattle with a split-single intramuscular administration of Folltropin-V in two concentrations of hyaluronan. *Theriogenology*. 2012. Vol. 77. P. 1679–1685.
319. Tuncer P. B., Bucak M. N., Buyukleblebici S., Sariozkan S., Yeni D., Eken A., Akalın P. P., Kinet H., Avdatek F., Fidan A. F., Gundogan M. The effect of cysteine and glutathione on sperm and oxidative stress

parameters of post-thawed bull semen. *Cryobiology*. 2010. Vol. 61. P. 303–307.

320. Umbaugh R. E. Superovulation and ovum transfer in cattle. *Am J Vet Res*. 1949. Vol. 10. P. 295–305.

321. Velazquez M. A., Newman M., Christie M. F., Cripps P. J., Crowe M. A., Smith R. F., Dobson H. The usefulness of a single measurement of insulin-like growth factor-1 as a predictor of embryo yield and pregnancy rates in a bovine MOET program. *Theriogenology*. 2005. Vol. 64. P. 1977–1994.

322. Velazquez M. A., Zaraza J., Oropeza A., Webb R., Niemann H. The role of IGF1 in the in vivo production of bovine embryos from superovulated donors. *Reproduction*. 2009. Vol. 137. P. 161–180.

323. Walsh J. H., Mantovani R., Duby R. T., Overstrom E. W., Dobrinsky J. R., Enright W. J., Roche J. F., Boland M. P. The effects of once or twice daily injections of pFSH on superovulatory response in heifers. *Theriogenology*. 1993. Vol. 40. P. 313–321.

324. Wang Q., Sun Q. Y. Evaluation of oocyte quality: morphological, cellular and molecular predictors. *Reprod Fertil Dev*. 2007. Vol. 19. P. 1–12.

325. Watanabe M. Laser treatment in small animals. Lasers, wounds and inflammation. Part 2. *Journal of Veterinary Medicine*. 1996. Vol. 49. P. 513–516.

326. Watson P. F. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. *Reprod Fertil Dev*. 1995. Vol. 7. P. 871–891.

327. Webb R., Gosden R. G., Telfer E. E., Moor R. M. Factors affecting folliculogenesis in ruminants. *Animal Science*. 1999. Vol. 68. P. 257–284.

328. Wenbin Y., Wenzhong L., Mengzhao L., Baotian Z., Laizeng A. I., Tongya L. Effects of laser radiation on Saanen buck's sperm energy metabolism. In *Proceedings of the sixth international conference on goats*. Beijing, China. 1996. P. 5–11.

329. Willet E. L., Black W. G., Casida L. E., Stone W. H., Buckner P. J. Successful transplantation of a fertilized bovine ovum. *Science*. 1951. Vol. 113. P. 247.

330. Williams E. J., Fischer D. P., Noakes D. E., England G. C., Rycroft A., Dobson H., Sheldon I. M. The relationship between uterine pathogen growth density and ovarian function in the postpartum dairy cow. *Theriogenology*. 2007. Vol. 68. P. 549–559.

331. Williams E. J., Fischer D. P., Pfeiffer D. U., England G. C., Noakes D. E., Dobson H., Sheldon I. M. Clinical evaluation of postpartum vaginal

mucus reflects uterine bacterial infection and the immune response in cattle. *Theriogenology*. 2005. Vol. 63. P. 102–117.

332. Wilmut I., Rowson L. E. Experiments on the low-temperature preservation of cow embryos. *Vet Rec*. 1973. Vol. 92. P. 686–690.

333. Wiltbank M., Lopez H., Sartori R., Sangsritavong S., Gumen A. Changes in reproductive physiology of lactating dairy cows due to elevated steroid metabolism. *Theriogenology*. 2006. Vol. 65. P. 17–29.

334. Zan-Bar T., Bartoov B., Segal R., Yehuda R., Lavi R., Lubart R., Avtalion R. R. Influence of visible light and ultraviolet irradiation on motility and fertility of mammalian and fish sperm. *Photomed Laser Surg*. 2005. Vol. 23. P. 549–555.

335. Zhang C. P., Li S. D., Chen Y., Jiang Y. M., Chen P., Wang C. Z., Fu X. B., Kang H. X., Shen B. J., Liang J. Stimulative Effects of Low Intensity He-Ne Laser Irradiation on the Proliferative Potential and Cell-Cycle Progression of Myoblasts in Culture. *International Journal of Photoenergy*. 2014. Vol. 2014. P. 1–8. Available online: <http://www.hindawi.com/journals/ijp/2014/205839>. Accessed 15 April 2016.

336. Zhevago N. A., Samoilova K. A. Pro- and anti-inflammatory cytokine content in human peripheral blood after its transcutaneous (in vivo) and direct (in vitro) irradiation with polychromatic visible and infrared light. *Photomed Laser Surg*. 2006. Vol. 24. P. 129–139.

337. Žilaitis V., Banyš A., Maruška R., Žiogas V. Klinikiniai endometrito diagnozavimo aspektai. *Veterinarija ir zootechnika*. 2004. T. 79. P. 41–44.

338. Žilaitis V., Rudejevienė J., Maruška R., Noreika A., Vorobjovas G., Balsytė J. Žemo intensyvumo lazerio terapijos įtaka karvių pieno liaukos sveikatingumui. *Veterinarija ir zootechnika*. 2006. T. 36. P. 97–100.

339. Žilaitis V., Žilinskas H., Juodžentis V., Aleknavičienė Z. Karvių reprodukcinės sistemos tyrimas ultragarsu. Kaunas: LSMU leidybos namai; 2013. P. 1–67.

## **PASKELBTOS PUBLIKACIJOS DAKTARO DISERTACIJOS TEMA**

Žilaitis V., Rudejevienė J., Juozaitienė V., Krištaponis V., **Palubinskas G.**, Malinowski E. The prevalence of clinical metritis and fertility indices in cows treated with low-intensity laser irradiation and antibiotics in the postpartum period. Veterinarški Arhiv. 2013. Vol. 83. P. 1–9.

**Palubinskas G.**, Žilaitis V., Juozaitienė V., Laučienė L., Juodzentis V., Gavelis A., Sederevičius A. Superovulatory response in relation to the size and side of ovary location in high yielding dairy cows on the first day of treatment protocol. Veterinarški Arhiv. 2016. Vol. 86. P. 65–76.

## **KITOS PASKELBTOS PUBLIKACIJOS**

Antanaitis R., Žilaitis V., Juozaitienė V., **Palubinskas G.**, Kučinskas A., Sederevičius A., Beliavska-Aleksiejūnė D. Efficient diagnostics and treatment of bovine mastitis according to herd management parameters. Veterinarija ir zootechnika. 2015. T. 69. P. 3–10.

## **DALYVAVIMAS KONFERENCIJOSE**

### **Tarptautinės konferencijos:**

1. IDF Pasaulinis pienininkystės kongresas – Tvarios pienininkystės svarba tenkinant mitybos poreikius. Vilnius, Lietuva, 2015 Rugsėjo 20–24. „**The Possibility to use low intensity laser irradiation to the superovulatory treatment of dairy cows–donors**“
2. Vet Congress Lithuania 2016. Kaunas, Lietuva. 2016 Kovo 18. „**The effect of low level laser irradiation for embryo yield**“.

### **Nacionalinė konferencija:**

Aukšto produktyvumo karvių reprodukcijos sutrikimų gydymas ir prevencija taikant inovatyvias technologijas, Kaunas, Lietuva, 2014 Lapkričio 05. Konferencijos metu pristaciau žodinį pranešimą tema: „**Superovuliacijos efektyvumo ir embrionų išeigos prognozavimas pagal**

**melžiamų karvių kiaušidžių dydį ir jų funkcinius darinius prieš superovuliacijos sukėlimą“.**

## **The prevalence of clinical metritis and fertility indices in cows treated with low-intensity laser irradiation and antibiotics in the postpartum period**

**Vytuolis Žilaitis<sup>1\*</sup>, Jūrate Rudejevienė<sup>1</sup>, Vida Juozaitienė<sup>1</sup>,  
Vaidas Krištaponis<sup>1</sup>, Giedrius Palubinskas<sup>1</sup>, and Edward Malinowski<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>*Department of Non-infectious Diseases, Veterinary Academy, Lithuanian University of Health Sciences, Kaunas, Lithuania*

<sup>2</sup>*Department of Pathophysiology of Reproduction and Mammary Gland, National Veterinary Research Institute of Poland, Poland*

---

**ŽILAITIS, V., J. RUDEJEVIENĖ, V. JUOZAITIENĖ, V. KRIŠTAPONIS, G. PALUBINSKAS, E. MALINOWSKI: The prevalence of clinical metritis and fertility indices in cows treated with low-intensity laser irradiation and antibiotics in the postpartum period. Vet. arhiv 83, 1-9, 2013.**

### **ABSTRACT**

The aim of the study was to compare the efficiency of low-intensity laser (LIL) irradiation, antibiotic injections and a combination of both methods in the prophylaxis and treatment of metritis in cows. Examinations were carried out on 290 freshly calved cows with a rectal temperature on the second day after parturition above 38.9 °C. Cows from group I (n = 95) were given an intramuscular injection of ceftiofur hydrochloride (600 mg) for three days, commenced from the second day after parturition. Group II consisted of 55 cows, the sacroiliac area of which was irradiated for 10 days consecutively with LIL. Group III (n = 65) were given an intramuscular 600mg injection of ceftiofur for three days and the sacroiliac area was irradiated 10 times consecutively, once a day with LIL. The control group IV (n = 55) were not given antibiotics or laser irradiation. A number of cows, ranging from 57.1% (group III a) to 65% (group IV), developed clinical metritis, which was treated with antiseptics. The longest recovery time from metritis (21 ± 6.12 d) was found in the IV group. Cows from group III recovered from metritis 11.5 days more quickly than the cows from the IV (negative control) group (P<0.05) and 4 days more quickly than cows from the I (positive control) group. Fertility indices such as: calving-first insemination, service period, conception rate, insemination index and the calving-pregnancy period, were better in cows treated prophylactically with the combined method (antibiotic and LIL physiotherapy) in comparison to the other groups.

**Key words:** cows, postpartum period, antibiotic, laser irradiation

---

\*Corresponding author:

Vytuolis Žilaitis, Department of Non-infectious Diseases, Veterinary Academy, Lithuanian University of Health Sciences, Tilzes 18, Kaunas, Lithuania, Fax: +370 37 362 417; E-mail: vytuolis@lva.lt

ISSN 0372-5480  
Printed in Croatia

1

## Introduction

In the treatment of metritis/endometritis antibiotics (GOSHEN and SHPIGEL, 2006), enzymes (DRILLICH et al., 2001), hormones (SHELDON et al., 2006) and an immunomodulator (KACZMAROWSKI et al., 2004), in addition to other medicines (PAISLEY et al., 1986; MALINOWSKI, 1995) have been used. A rectal temperature (RT) above 39 °C is considered to be a valid indication for the start of uterus inflammation (PALENIK et al., 2009). KRISTULA et al. (2001) reported that cows experiencing no clinical problems at calving or during early postpartum had an average RT below 38.9 °C for each day during the first 10 days postpartum. However, cows with metritis may have rectal temperatures within the normal range and may not necessarily develop a fever. BENZAQUEN et al. (2004) found that over half of the cows diagnosed with metritis during the first week postpartum did not have a fever. Programs for the prevention or reduction of uterine infections included the local or systemic administration of antibiotics and/or the application of hormones (DOBSON and NOAKES 1990; CAIROLI et al., 1993; LEWIS 1997; ARLT et al., 2009). In recent years, while searching for new, more efficient and organic methods for treatment and prophylaxis, light therapy and the promising method of low-intensity laser irradiation have been widely discussed. Low-intensity laser irradiation affects cell metabolism, stimulates regeneration, and reduces pain and inflammation (HUANG et al., 2009). The objective of the study was to compare the efficiency of low-intensity laser (LIL) irradiation versus antibiotics and a combination of them in the prophylaxis and treatment of metritis in cows.

## Materials and methods

Examinations were carried out on 290 cows calved physiologically in the period between January -June of 2008, without obvious clinical traits of disorders immediately after parturition, in which the RT was higher than 38.9 °C on the second day after parturition. The cows belonged to the Lithuanian Black-and-White, Danish Black-and-White, and German Black-and-White cattle breeds. The age of the cows ranged from two to eight years, and the average milk yield amounted to 6850 kg per lactation. The animals were allocated into 4 groups (Table 1). The first group of 95 fresh dairy cows received prophylactically an intramuscular injection of 12 mL of Excenel RTU® (ceftiofur hydrochloride -50mg, Pfizer animal health, Belgium) for three consecutive days, from the second day after parturition. The second group comprised 55 cows. Their sacroiliac area was irradiated for 10 days consecutively with LIL STP-99 as the only prophylactic action. The exposure to LIL therapy amounted to three minutes per day. The third group comprised 65 fresh dairy cows which were given an intramuscular injection of 1mL of Excenel RTU® for three consecutive days (as in group I). Their sacroiliac area was irradiated 10 times consecutively, once a day, with LIL. For the control (group IV) 55

similar cows were selected. This group did not receive antibiotic or laser irradiation, but were i.m. injected with 12 mL of saline for three days consecutively.

Table 1. The structure of examinations

| Group | Name of group    | Number of cows | Method of treatment                                               |
|-------|------------------|----------------|-------------------------------------------------------------------|
| I     | Positive control | 95             | Excenel RTU® 12 mL*; 1 × d for 3d                                 |
| II    | Experimental     | 55             | Laser STP-99; 1 × d for 10 d                                      |
| III   | Experimental     | 65             | Excenel RTU® 12 mL; 1 × d for 3d +<br>Laser STP-99; 1x d for 10 d |
| IV    | Negative control | 55             | 12 mL of saline; 1 × d for 3d                                     |

\*ceftiofur hydrochloride 50 mg/1 mL

The morbidity from metritis and other diseases of cows from each group were recorded. Animals that are not systemically sick but have an abnormally enlarged uterus and a purulent uterine discharge detectable in the vagina, within 21 days postpartum, may be classified as having clinical metritis (SHELDON et al., 2006). The cows that showed signs of metritis 10-15 days after parturition were treated with antimicrobials Jodofoam® (iodine 0.2 g; potassium iodine 0.4 g; solvent and gas carrier ad 45.2 g, Biofactor, Poland), Jodouter® (Povidonum iodinum 10%) -10 g in 100 mL of carrier substance (Bioveta, the Czech Republic), Fatroximin® (rifaksimini 300 mg, Fatro, Italy), Pharmasin® (tylosin 5 g Actavis AB, Sweden), Clamoxyl metritis® (amoxicillin 0.84 g, Pfizer animal health, Belgium) intrauterinely once a week. Intramuscular injections of oestrophan and oxytocin were administered between intrauterine applications. These therapies were continued with the changing of the antimicrobial agent every seven days until the uterus recovered its tone and pathological discharges had ceased. The recovery time from metritis (the time until the eradication of the signs of metritis; or the duration of treatment) was recorded.

For all groups the fertility indices as: days open (time from calving to the first insemination), service period (time from the first to the effective insemination), conception rate (percentage of pregnancies as an effect of the first insemination), insemination index (number of inseminations for each pregnancy), calving-pregnancy period (time from the last to the subsequent pregnancy), pregnancy rate (percentage of cows that became pregnant) and culling rate from infertility were calculated.

The test data was processed using the SPSS statistical package, (Chicago, IL, USA, 2006). Data are considered to be statistically reliable when  $P < 0.05$ .

### Results

From Table 2 it can be observed that a number of cows from each group developed clinical metritis. The highest percentage of cows (over 65%) treated for metritis was noted in the negative control group (IV), and the lowest in group III. The results demonstrate

that the group of cows did not have a significant influence on the morbidity from metritis ( $\chi^2 = 1.401$ , DF = 3, P = 0.705).

Table 2. Percentages of metritis and recoveries following combined treatment with regard to the prophylactic methods applied after calving

| Groups of cows            | Morbidity of metritis |       | Time to recovery (days) |          |       |
|---------------------------|-----------------------|-------|-------------------------|----------|-------|
|                           | n                     | %     | $\bar{x}$               | $\sigma$ | $m_x$ |
| I <sup>a</sup> (n = 95)   | 57                    | 60.0  | 14.0 <sup>a,b</sup>     | 5.23     | 1.67  |
| II <sup>b</sup> (n = 55)  | 34                    | 61.8  | 19.4                    | 7.46     | 2.33  |
| III <sup>c</sup> (n = 65) | 38                    | 58.4  | 12.3 <sup>c,d</sup>     | 2.40     | 0.75  |
| IV <sup>d</sup> (n = 55)  | 36                    | 65.45 | 20.0                    | 5.31     | 1.64  |

\* P<0.05 (a,b, c,d)

The time of recovery from inflammation was slightly shorter in the group treated with LIL than in the negative control group. The recovery time from metritis for the cows treated with antibiotics (group I) was 5.4 days (27.8%) less than the cows from group II which were treated with LIL alone (P<0.05). The duration of recovery from metritis of the cows that were treated with LIL and antibiotics after parturition (group III) was 7.1 days less than the group treated solely with laser irradiation (P<0.05). The recovery time of the cows treated with ceftiofur (group I) was indicated to be 6 days (30.0%) less than the cows from group IV. The shortest recovery time from metritis was noted in group III. This was 7.7 days (38.5%) less than cows from the negative control (IV) group and by 2 days (on average) in comparison to the first group.

Table 3 presents the fertility indicators of the experimental and control cows. The time from calving to the first insemination (days open) was the longest in cows from the negative control group and from the positive control group, and the shortest in cows treated with the antibiotic and LIL. Compared to the negative control, it was, on average, 16.0 days shorter (P<0.05). Laser alone decreased this period by 7.6 days (P>0.05) when compared to the negative control group. There was a common trend observed in the groups that were only treated with the LIL therapy, in that the period from the first to effective insemination had decreased, while the conception rate at the first insemination had increased. This longer time of LIL therapy did not have any significant impact on the fertility indices. LIL treatment had a positive, however statistically insignificant, effect on conception rate and the insemination index. A significant effect in the use of laser therapy was found regarding the calving-pregnancy period. The maximal change in this rate was observed under the treatment using both antibiotics and LIL irradiation. Compared to the negative control, the calving-pregnancy period was reduced by about 31.6 days (P<0.05). The group treated with LIL and antibiotics included the highest number of cows for which the calving-pregnancy period was between 80 and 100 days. This group did not contain a

significant number of cows for which the calving-pregnancy period was longer than 160 days. From Table 3 it is also discernible that pregnancy rates were almost identical in all groups. The culling rate from infertility was the highest in the negative control group. However, the differences between the groups were not statistically significant.

Table 3. Fertility indicators of cows treated prophylactically with different methods after calving

| Fertility indicators           | Groups                    |                           |                           |                           |
|--------------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
|                                | I                         | II                        | III                       | IV                        |
|                                | $\bar{x} \pm \sigma, m_x$ | $\bar{x} \pm \sigma, m_x$ | $\bar{x} \pm \sigma, m_x$ | $\bar{x} \pm \sigma, m_x$ |
| Calving-first insemination (d) | 63.1 $\pm$ 8.3; 2.59      | 54.5 $\pm$ 9.2; 2.92      | 46.1 $\pm$ 9.6; 3.01      | 62.1* $\pm$ 10.4; 3.27    |
| Service period (d)             | 60.2 $\pm$ 10.2; 3.17     | 47.2 $\pm$ 8.2; 2.53      | 42.6 $\pm$ 7.3; 2.33      | 61.5 $\pm$ 10.2; 3.02     |
| Conception rate (%)            | 46.0                      | 46.0                      | 51.0                      | 42.0                      |
| Insemination index             | 2.4 $\pm$ 1.13; 0.35      | 2.2 $\pm$ 1.2; 0.37       | 2.0 $\pm$ 1.2; 0.33       | 2.6 $\pm$ 1.51; 0.30      |
| Calving-pregn. period (d)      | 123.3 $\pm$ 28.1; 9.00    | 102.1 $\pm$ 10.7; 3.44    | 91.9 $\pm$ 17.4; 5.04     | 123.5* $\pm$ 23.2; 7.29   |
| Pregnancy rate (%)             | 90.5                      | 88.0                      | 90.4                      | 87.5                      |
| Culling from infertility (%)   | 4.2                       | 4.0                       | 3.6                       | 7.5                       |

\*  $P < 0.05$  (a;b;c;d)

The research showed that there was no significant relationship between the group of cows and conception rate ( $\chi^2 = 0.98$ , DF = 3,  $P = 0.806$ ), pregnancy rate ( $\chi^2 = 0.567$ , DF = 3,  $P = 0.904$ ) and culling for infertility of cows ( $\chi^2 = 1.419$ , DF = 3,  $P = 0.701$ ).

In addition, the irradiation of cows with LIL, as well as a combination of antibiotic and laser treatment affected other cases of pathology (such as uterine atony, mammary gland inflammations, and digestive system disorders). Compared to the negative control, the necessity for treatment of these pathologies was reduced by 21.1% with regard to earlier LIL therapy alone, and by 27.5% ( $P < 0.05$ ) with regard to LIL treatment combined with antibiotics.

### Discussion

According to the data found in various literatures, the treatment of metritis is controversial (LEWIS, 1997; DRILLICH et al., 2001; LeBLANC et al., 2002) and prevention is difficult because the causes cannot be clearly defined (LEWIS, 1997). The species of bacteria found in the uterus after parturition are similar in healthy and sick cows (KACZMAROWSKI et al., 2004). However, it has been noted that early intrauterine

antibiotic treatment significantly reduces the complications caused by *Actinomyces pyogenes* (DOBSON and NOAKES, 1990). Thus, the demand for alternative therapies has been increasing in the last several years (ARLT, 2006). For the treatment of septic inflammation it is appropriate to use antibiotics. A rectal temperature above 39 °C is considered to be a valid indication of the start of uterus inflammation (PALENIK et al., 2009). In this study cows with a rectal temperature above 38.9 °C were selected for the prophylaxis of clinical metritis. KRISTULA et al. (2001) recorded that cows experiencing no clinical problems at calving or during early postpartum had an average rectal temperature below 38.9 °C each day throughout the first 10 days postpartum. Daily average temperatures of 38.9 °C or higher in cows with purulent lochia occurred only on Day 4, while these temperatures persisted from Day 1 to Day 7 postpartum in cows with putrid lochia (PALENIK et al., 2009). KRISTULA et al. (2001) and BENZAQUEN et al. (2004), observed the highest occurrence of fever in cows with puerperal metritis between Day 3 and 6 postpartum. Independently of the method used for prophylaxis (antibiotics, laser irradiation or a combination of both these methods) the following indicators usually changed: the duration of recovery from metritis, and the calving-pregnancy period. The duration of treatment of metritis that developed in cows prophylactically treated with LIL and antibiotic was less than of those treated with antibiotics alone. The period from parturition to the successful insemination of cows is an objective indicator of reproductive function and it is considered to be the key indicator in assessing fertilization (KUHN et al., 2004). It was noted that the calving-pregnancy period of cows treated prophylactically with LIL immediately after calving was shorter in comparison to the negative control cows. This indicator was also better in the cows treated prophylactically with antibiotic injections in conjunction with LIL irradiations than in cows treated with antibiotics alone. In comparing fertility indicators a direct relationship was obtained: the most effective prevention method was found to be laser treatment and antibiotics, antibiotics alone were moderately effective, and the least effective was laser treatment alone. The use of low levels of visible or near infrared light for reducing pain, inflammation and oedema, promoting the healing of wounds, deeper tissues and nerves, and preventing cell death and tissue damage has been reviewed by HUANG et al. (2009). The positive influence of laser irradiation on the uterus in cows immediately after parturition is probably connected with the regulatory effect on pro-and anti-inflammatory human cytokines *in vivo* and *in vitro* (ZHEVAGO and SAMOILOVA, 2006), and with the stimulation of the immunological system *in vivo* (NOVOSELOVA et al., 2006). This kind of light stimulates the proliferation of different kinds of cells (PINHEIRO et al., 2003; SHANYFELT et al., 2008), increases cell growth for cells stressed by nutritional deficits *in vitro* (EDUARDO et al., 2007) as well as the inhibition of apoptosis in cells participating in the process of skin regeneration (CHYCZEWSKI et al., 2010). The bactericidal effect of LIL irradiation (ŽILAITIS et al., 2006) can also be considered.

In conclusion, prophylactic LIL physiotherapy shortly after parturition reduces the need for metritis treatment and improves some fertility indices in dairy cows. LIL physiotherapy in conjunction with injections of cephalosporin is more prophylactically effective than cephalosporin applied alone. The most clinically efficient method of LIL therapy is one session per day for 10 consecutive days, immediately after parturition. This method of treatment is suitable for cows with a wide range of productivity and ages.

## References

- ARLT, S. (2006): Naturheilverfahren auf dem Prüfstand. Tierärztl. Umschau 61, 332-333.
- ARLT, S., W. PADBERG, M. DRILLICH, W. HEUWIESER (2009): Efficacy of homeopathic remedies as prophylaxis of bovine endometritis. J. Dairy Sci. 92, 4945-4953.
- BENZAQUEN, M. E., C. A. RISCO, L. F. ARCHBALD, M. J. THATCHER, W. W. THATCHER. (2004): Evaluation of rectal temperature and calving relating factors on the incidence of metritis in postpartum dairy cows. In: 37<sup>th</sup> Annual Convention Proceedings American Association of Bovine Practitioners Convention, Ft. Worth (ed.), Texas, USA, September 23-25, pp. 197-198.
- CAIROLI, F., L. FERRARIO, S. CARLI, F. SOLDANO (1993): Efficacy of oxytetracycline and tetracycline-benzylamine in the prevention of infection after placental retention in cattle. Vet. Rec. 133, 394-395.
- CHYCZEWSKI, M., A. ROZICKA, A. MIKOŁAJCZYK, T. ROTKIEWICZ, P. HOLAK, M. JALYNSKI, Z. ROTKIEWICZ (2010): Effect of laser biostimulation on cell proliferation in the healing of cutaneous surgical wounds in pigs. Bull. Vet. Inst. Pulawy 54, 217-221.
- DOBSON, D. P., D. E. NOAKES (1990): Use of a uterine pessary to prevent infection of the uterus of the cow after parturition. Vet. Rec. 127, 128-131.
- DRILLICH, M., O. BEETZ, A. PFUTZNER, M. SABIN, H. J. SABIN, P. KUTZER, H. NATTERMANN, W. HEUWIESER (2001): Evaluation of a systemic antibiotic treatment of toxic puerperal metritis in dairy cows. J. Dairy Sci. 84, 2010-2017.
- EDUARDO, F. P., D. U. MEHNERT, T. A. MONEZI, D. M. ZECELL, M. M. SCHUBERT, C. P. EDUARDO, M. M. MARQUES (2007): Cultured epithelial cells response to phototherapy with low intensity laser. Lasers Surg. Med. 39, 365-372.
- HUANG, Y. Y., A. C. CHEN, J. D. CARROLL, M. R. HAMBLIN (2009): Biphasic dose response in low level light therapy. Dose-Response 7, 358-383.
- GOSHEN, T., N. Y. SHPIGEL (2006): Evaluation of intrauterine antibiotic treatment of clinical metritis and retained fetal membranes in dairy cows. Theriogenology 66, 2210-2218.
- KACZMAROWSKI, M., E. MALINOWSKI, H. MARKIEWICZ (2004): Influence of various treatment methods on bacteriological findings in cows with puerperal metritis. Pol. J. Vet. Sci. 7, 171-174.
- KRISTULA, M., B. I. SMITH, A. SIMEONE (2001): The use of daily postpartum rectal temperature to select dairy cows for treatment with systemic antibiotics. Bovine Pract. 35, 117-125.

- KUHN, M. T., P. M. VANRADEN, J. L. HUTCHISON (2004): Use of early lactation open days records for genetic evaluation of cow fertility. *J. Dairy Sci.* 87, 2277-2284.
- LeBLANC, S. J., T. F. DUFFIELD, K. E. LESLIE, K. G. BATEMAN, G. F. KEEFE, J. S. WALTON, W. H. JOHNSON (2002): The effect of treatment of clinical *endometritis* on reproductive performance in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 85, 2237-2249.
- LEWIS, G. S. (1997): Uterine health and disorders. *J. Dairy Sci.* 80, 984-994.
- MALINOWSKI, E. (1995): Causes, pathogenesis and treatment of postpartum metritis in cows. *Med. Wet.* 51, 717-720.
- NOVOSELOVA, E. G., O. V. GLUSHKOVA, D. A. CHERENKOV, V. M. CHUDNOVSKY, E. E. FESENKO (2006): Effects of low-power laser radiation on mice immunity. *Photodermatol. Photoimmun. Photomed.* 22, 33-38.
- PAISLEY, L. G., W. D. MICKELSEN, P. B. ANDERSON (1986): Mechanisms and therapy for retained fetal membranes and uterine infections of cows: a review. *Theriogenology* 25, 353-381.
- PALENIK, T., R. DOLEZEL, J. KRATOCHVIL, S. CECI, J. ZAJIC, Z. JAN, M. VYSKOCIL (2009): Evaluation of rectal temperature in diagnosis of puerperal metritis in dairy cows. *Vet. Med. Czech.* 54, 149-155.
- PINHEIRO, A. L. B., F. A. LIMEIRA JUNIOR, M. E. M. GERBI, L. M. P. ROMALHO, C. MARZOLA, E. A. C. PONZI (2003): Effect of low level laser therapy on the repair of bone defects grafted with inorganic bovine bone. *Braz Dent J.* 14, 177-181.
- SHANYFELT, L. M., P. L. DICKRELL, H. F. EDELHAUSER, D. W. HAHN (2008): Effect of laser repetition rate on corneal tissue ablation for 193-nm excimer laser light. *Lasers Surg. Med.* 40, 483-493.
- SHELDON, I. M., G. S. LEWIS, S. LeBLANC, R. O. GILBERT (2006): Defining postpartum uterine disease in cattle. *Theriogenology* 65, 1516-1530.
- ZHEVAGO, N. A., K. A. SAMOILOVA (2006): Pro-and anti-inflammatory cytokine content in human peripheral blood after its transcutaneous (*in vivo*) and direct (*in vitro*) irradiation with polychromatic visible and infrared light. *Photomed Laser Surg.* 24, 129-139.
- ŽILAITIS, V., J. RUDEJEVIENĖ, R. MARUŠKA, A. NOREIKA, G. VOROBYOVAS, J. BALSYTĖ (2006): Žemo intensyvumo lazerio terapijos įtaka karvių pieno liaukos sveikatingumui. *Vet. zoot.* 36, 97-100.

Received: 24 January 2012

Accepted: 27 June 2012

**ŽILAITIS, V., J. RUDEJEVIENĖ, V. JUOZAITIENĖ, V. KRIŠTAPONIS, G. PALUBINSKAS, E. MALINOWSKI: Prevalencija kliničkog metritisa i pokazatelji plodnosti u krava liječenih slabijim laserskim zračenjem i antibioticima u postpartalnom razdoblju. Vet. arhiv 83, 1-9, 2013.**

**SAŽETAK**

U radu se uspoređuje učinkovitost slabijeg laserskog zračenja, primjene antibiotika i kombinacije obiju metoda u profilaksi i liječenju metritisa u krava. Istraživanje je bilo provedeno na 290 netom otejenih krava s rektalnom temperaturom višom od 38,9 °C drugog dana nakon teljenja. Kravama I. skupine (n = 95) intramuskularno je bio primijenjen ceftiofur hidroklorid (600 mg) tijekom tri dana, počevši drugog dana nakon teljenja. U II. skupini bilo je 55 krava koje su bile zračene laserskim zračenjem u sakroilijačnom području tijekom 10 uzastopnih dana. Kravama III. skupine (n = 65) intramuskularno je bio primijenjen ceftiofur hidroklorid (600 mg) tijekom tri dana, a bile su zračene laserskim zračenjem u sakroilijačnom području tijekom 10 uzastopnih dana jedanput dnevno. Kontrolna skupina IV (n = 55) nije dobivala antibiotik niti je bila zračena. U određenog broja krava, od 57,1% (skupina IIIa) do 65% (skupina IV), razvio se klinički metritis, koji je bio liječen antisepticima. Najduže vrijeme oporavka od metritisa ( $21 \pm 6,12$  d) ustanovljeno je u skupini IV. Krave skupine III oporavile su se od metritisa za 11,5 dana brže od krava IV. (negativne kontrolne) skupine ( $P < 0,05$ ) i četiri dana brže od krava I. (pozitivne kontrolne) skupine. Pokazatelji plodnosti poput prvoga osjemenjivanja nakon teljenja, servisnog perioda, stope začeca, indeksa osjemenjivanja i razdoblja od teljenja do bređosti bili su bolji u krava kojima je bio profilaktički primijenjen antibiotik u kombinaciji s laserskim zračenjem u usporedbi s drugim skupinama.

**Ključne riječi:** krave, postpartalno razdoblje, antibiotik, lasersko zračenje

**Superovulatory response in relation to the size and side of ovary location in high yielding dairy cows on the first day of treatment protocol**

**Giedrius Palubinskas\*, Vytuolis Žilaitis, Vida Juozaitienė, Lina Laučienė, Vilmantas Juodžentis, Aurimas Gavelis, and Antanas Sederevičius**

*Faculty of Veterinary Medicine, Lithuanian University of Health Sciences, Kaunas, Lithuania*

**PALUBINSKAS, G., V. ŽILAITIS, V. JUOZAITIENĖ, L. LAUČIENĖ, V. JUODŽENTIS, A. GAVELIS, A. SEDEREVIČIUS: Superovulatory response in relation to the size and side of ovary location in high yielding dairy cows on the first day of treatment protocol. Vet. arhiv 86, 65-76, 2016.**

**ABSTRACT**

The aim of this research was to determine the relation between the size of ovaries, their topographic position, ovarian structures (follicles (F) and corpora lutea (CL)) before superovulatory treatment and the superovulatory response and embryo yield. Holsteinized dairy cows (32) were treated for superovulation with Pluset® (Laboratorios Calier, S.A., Barcelona, Spain). On Day 1 of the superovulatory treatment and during the procedure to recover the embryos, we examined the ovaries of donors with an ultrasound scanner. The ovaries were divided into 3 groups according to their size. Group 1 ovaries ( $<668.0 \text{ mm}^2$ ) were more than 25 % smaller and Group 3 ovaries ( $>1112.0 \text{ mm}^2$ ) were 25 % larger than Group 2 ovaries, the area of which varied from 668.0 to 1112.0  $\text{mm}^2$  (mean,  $890.0 \text{ mm}^2 \pm 25 \%$ ). After superovulation, the mean area of the right side ovaries (RSO) ( $3147.61 \pm 106.6 \text{ mm}^2$ ) was by 27.3 % ( $P<0.05$ ) larger than the mean area of the left side ovaries (LSO). Irrespective of location, the ovaries after superovulation increased 3.2 times; however, the increase in the RSO, except for Group 3, was 14 % more intense ( $P>0.05$ ) compared with the LSO. The most intense response to the superovulatory treatment by ovary size was observed in Group 1 ovaries: the RSO increased by 5.5 times and the LSO by 4.8 times, but according to the absolute measure, the greatest increase was observed in Group 3, where ovaries on both sides increased 2.4 times. According to the number of CL, Group 1 RSO donors showed a 2.3 times ( $P<0.05$ ) weaker response to the superovulatory treatment in comparison with Group 3 RSO donors. The number of embryos recovered ( $9.8 \pm 2.2$ ) was 3.6 times ( $P<0.05$ ) higher among the donors with Group 3 RSO before superovulation, compared with the donors' Group 1 RSO ( $2.7 \pm 0.5$ ). The number of transferable embryos was 3.2 times ( $P<0.05$ ) higher in cows with Group 3 ( $6.3 \pm 0.6$ ) RSO in comparison with the donors' Group 1 ( $2.0 \pm 0.3$ ) RSO. Corpora lutea in the RSO demonstrated a significant impact of 85 % ( $P<0.05$ ) on the yield of embryos, compared with only 30 % ( $P<0.05$ ) for the LSO.

**Key words:** donors, cows, superovulatory treatment, superovulatory response, embryo yield

\*Corresponding author:

Giedrius Palubinskas, Lithuanian University of Health Sciences, Tilžės g. 18, LT47181, Kaunas, Lithuania, Phone: +370 616 19245; E-mail: giedrius.palubinskas@ismuni.lt

ISSN 0372-5480  
Printed in Croatia

65

## Introduction

Embryo transfer is usually performed in dry dairy cows. However, such cows are subjected to stricter selection requirements, as milk production is one of the health risk factors (MAILLO et al., 2012). The response of dairy cows to the superovulatory treatment is hard to predict. Ovarian response to superovulatory treatment depends on a series of factors: the milk production, negative energy balance, general health condition, and individual characteristics of the animals (CABRERA et al., 2013; KUBOVIČOVÁ et al., 2013; TAMADON et al., 2011). According to SEIDEL et al. (2003), 27 % of all healthy donors produce from 0 to 1 embryo, 54 % of donors from 2 to 10 embryos, and only 20 % of donors produce 11 or more embryos. Similar data were presented by SCHATTEEN and CONSTANTINESCU (2007), who stated that not a single embryo was flushed from 24 % of cow-donors and as much as 70 % of flushed embryos were obtained from 30 % of donors. No unanimous opinion about the selection criteria for donors has been achieved between researchers. Nevertheless, a certain correlation between ovarian structures and the response to the superovulatory treatment has been noted (GRIZELJ et al., 2013). Ultrasound examinations of animals have become increasingly used in practice. Thus, it should be analysed how cows - potential donors of embryos - are to be assessed and selected for embryo production. The method described in this study may be used for this purpose.

The size of ovaries is closely related to the wave-like manner in normal cycling cattle (PENG et al., 2011). The size of an ovary is determined by functional formations, i.e. follicles (F) and corpora lutea (CL) (CUSHMAN et al., 2010). The size of the CL correlates with the concentration of progesterone (KAYACIK et al., 2005), and cows with increased concentrations of progesterone demonstrate a more active and effective response at the beginning of a superovulation scheme compared with cows with reduced concentrations of progesterone (KUDLAČ et al., 1991). The ovarian function in cows depends on the presence of primordial follicles (SILVA-SANTOS et al., 2013). A large number of such follicles in the contralateral ovary correlates with the number of CL after induction of polyovulation (CUSHMAN et al., 1999). A cow is considered to be more suitable as a donor cow and produce more embryos when there are no large F at the beginning of induction of superovulation (HELEIL and EL DEEB, 2010). A certain morphological and functional asymmetry of ovaries has been noted. Past gestations have demonstrated that the right ovary is more active than the left one by 14 % (GEREŠ et al., 2011).

The aim of this work was to assess by ovarian ultrasonography the relationship between the size of ovaries, their left/right side position, ovarian structures (F and CL), the superovulatory response, and embryo yield.

### Materials and methods

For the purposes of this study, we selected 32 clinically healthy holsteinized Lithuanian Black and White cows, held in a loose-housing system and which had calved 75-90 days before; their productivity during the previous lactation was 9,500-10,500 kg.

The donors' daily ration included corn silos (24 kg), haylage (11 kg), barley straw (0.8 kg), molasses (0.5 kg), and composite feed (8.74 kg) composed of dried sugar-beet slices (20.59 %), soy bean meal (17.16 %, of which 49 % protein content), triticale (34.32 %), rape cake (22.88 %), Bergophor CaProVit H mineral (2.29 %), fodder limescale (0.8 %), salt (NaCl, 0.34 %), monocalcium phosphate (0.69 %), and sodium bicarbonate (0.93 %).

For the study, only the cows with CL larger than 10 mm and no follicle larger than 10 mm in the right or left ovary were selected before starting the superovulatory treatment.

The donors were treated for superovulation with Pluset® (follicle stimulating hormone (FSH) and luteinizing hormone (LH) at the ratio 1:1; Laboratorios Calier, S.A., Barcelona, Spain) at any time of the oestrus cycle. As for the solution, 1 mL of Pluset® contained 35 IU FSH and 35 IU LH and the total dose per donor was 700 IU.

The superovulatory treatment was induced according to the following scheme (Table 1) (LAFRI et al., 2002; SEIDEL et al., 2003).

Table 1. Superovulatory treatment of donors

| No | Days of superovulation |         | Procedures performed                                                              |
|----|------------------------|---------|-----------------------------------------------------------------------------------|
| 1. | Day 1                  |         | Introduction of intravaginal implant CIDR containing 1.38 g of progesterone       |
| 2. | Day 6                  | Morning | I/m injection of 4 mL of Pluset 140 IU                                            |
|    |                        | Evening | I/m injection of 4 mL of Pluset 140 IU                                            |
| 3. | Day 7                  | Morning | I/m injection of 3 mL of Pluset 105 IU                                            |
|    |                        | Evening | I/m injection of 3 mL of Pluset 105 IU                                            |
| 4. | Day 8                  | Morning | I/m injection of:<br>- 2 mL of Cloprostenol<br>- 2 mL of Pluset 70 IU             |
|    |                        | Evening | I/m injection of:<br>- 2 mL of Cloprostenol<br>- 2 mL of Pluset 70 IU             |
| 5. | Day 9                  | Morning | - removal of intravaginal implant CIDR<br>- i/m injection of 1 mL of Pluset 35 IU |
|    |                        | Evening | I/m injection of 1 mL of Pluset 35 IU                                             |
| 6. | Days 10-11             |         | Artificial insemination                                                           |
| 7. | Day 18                 |         | Embryo recovery                                                                   |

The insemination was performed on Days 10-11 according to the signs of the oestrus (twice at an interval of 12 hours). Embryos were collected after 7 days, using a nonsurgical embryo recovery method with a Rusch catheter. The embryos were flushed with BoviFlush medium with BSA and antibiotics, manufactured by Minitube, Germany. For each flushing we used 1000 mL of medium per donor.

On Day 1 of superovulatory treatment, before inserting the implant Pride of Progesterone (CIDR®, Pfizer, Inc.), and on Day 18 when the embryos were recovered, the length and width of the ovaries and the number of ovarian structures (F and CL) were examined using Digital Diagnostic Ultrasound Devices (HG 9300, Caresono Technology Co., Ltd) with a 7 MHz rectal transducer. On Day 18, the ovaries were examined by ultrasonography and the efficiency of superovulation was determined according to the number of CL and the ovary size. The sizes of the ovaries were calculated by multiplying the widths and lengths, and the ovaries were divided into 3 groups according to the ovary area. Group 1 (<668.0 mm<sup>2</sup>) ovaries were 25 % smaller and Group 3 ovaries (>1112.0 mm<sup>2</sup>) were 25 % larger than Group 2 ovaries (890.0 mm<sup>2</sup> ± 25 %), with ovary areas varying from 668.0 to 1112.0 mm<sup>2</sup> (Table 2):

Table 2. Groups of ovaries based on their area (the product of width and length) before superovulatory treatment

| Ovaries groups | Ovaries size before superovulatory treatment (mm <sup>2</sup> ) |
|----------------|-----------------------------------------------------------------|
| No. 1          | <668.0                                                          |
| No. 2          | 668.0 - 1112.0                                                  |
| No. 3          | >1112.0                                                         |

RSO- right ovary size; F-follicle; CL-corpus luteumThe data were statistically processed using the SPSS statistical package (IBM SPSS for Windows 20.0 SPSS Inc., Chicago, IL, USA, 2011). For the statistical analysis of the data, descriptive statistics and the multifactor analysis ANOVA test were used. The data were considered statistically significant when  $P < 0.001$ ;  $P < 0.05$ .

## Results

The mean ovary area ( $990.21 \pm 57.3$  mm<sup>2</sup>) on the right side in the donors, before starting superovulation, was 26.6 % ( $P < 0.05$ ) larger than the mean ovary area on the left side (Table 3).

Before superovulation, the RSO were assessed in 62.5 % of Group 2 and LSO in 50 % of Group 1.

Table 3. Ovary area (mm<sup>2</sup>) depending on the side of location before and after superovulatory treatment

| Ovaries groups    | Before superovulatory treatment |                            | After superovulatory treatment |                              |
|-------------------|---------------------------------|----------------------------|--------------------------------|------------------------------|
|                   | Left ovary                      | Right ovary                | Left ovary                     | Right ovary                  |
| No.1              | 428.5 ± 23.3                    | 441.33 ± 84.6              | 2047.67 ± 112.4                | 2410.67 ± 18.4               |
| No.2              | 850.75 ± 17.45                  | 883.0 ± 151.78             | 2334.0 ± 53.7                  | 2661.50 ± 123.2              |
| No.3              | 1244.5 ± 125.92                 | 1825.0 ± 70.9              | 3036.0 ± 64.2                  | 4370.67 ± 205.7              |
| Average:          | 782.29 ± 37.7 <sup>a</sup>      | 990.21 ± 57.3 <sup>b</sup> | 2472.6 ± 50.5 <sup>c</sup>     | 3147.61 ± 106.6 <sup>d</sup> |
| Average in total: | 886.25 ± 487.9                  |                            | 2810.08 ± 133.7                |                              |

a,b, c,d, rows with different superscript differ significantly (P<0.05)

After superovulation, the mean size of the RSO (3147.61 ± 106.6 mm<sup>2</sup>) was 27.3 % (P<0.05) larger compared with the LSO. Irrespective of location, after superovulation, the ovaries increased on the average 3.2 times; however, the increase in the RSO, except for Group 3, was 14 % (P>0.05) more intense compared with the LSO. It was determined that in Group 1 the RSO increased by 5.5 times and the LSO by 4.8 times. In Group 2 ovaries on both sides increased on average by 2.7-3.0 times. The smallest increase was observed in Group 3 ovaries on both sides, of only about 2.4 times. According to the absolute measure, the greatest increase after superovulation was observed in Group 3 RSO.

The results demonstrated a moderate but statistically significant correlation between the sizes of the RSO and LSO (Table 4). In fact, if the ovaries are bigger on one side, they will also be bigger on the other side. The ovary size is determined by the expression of ovarian structures. No statistically significant or reliable relationship between the ovary size and the number of CL was established. The size of the RSO showed (r = 0.865, P<0.005) a 2.1 times (P<0.05) stronger correlation with the number of F in comparison with the left ovary (r = 0.42, P<0.05). The number of F appeared to have an essential impact on the size of the ovaries.

Table 4. Statistical relation between ovary size and ovarian structures before superovulatory treatment

| Structures of ovaries     | Pearson correlation | Left ovary |        | Right ovary |         |
|---------------------------|---------------------|------------|--------|-------------|---------|
|                           |                     | Size       | F      | Size        | F       |
| Right ovary size          | r                   | 0.549*     | 0.287  | 1           | 0.865** |
| Right ovary follicles     | r                   | 0.636*     | 0.625* | 0.865**     | 1       |
| Right ovary corpora lutea | r                   | -0.236     | -0.866 | 0.002       | -0.322  |
| Left ovary follicles      | r                   | 0.42*      | 1      | 0.549*      | 0.636*  |
| Left ovary corpora lutea  | r                   | 0.631      | 0.24   | 0.287       | 0.625   |

rows with \*\*coefficient of correlation significance (P<0.005); rows with \*coefficient of correlation significance (P<0.05); F-follicle

The size of the RSO and LSO before superovulation correlated statistically reliably with the size (right  $r = 0.648$ ,  $P < 0.05$  and left  $r = 0.708$ ,  $P < 0.001$ ), and with the CL (right  $r = 0.758$ ,  $P < 0.05$  and left  $r = 0.723$ ,  $P < 0.05$ ) of RSO after superovulation. The size of the LSO before superovulation demonstrated a statistically reliable ( $P < 0.05$ ) correlation with the number of F of LSO after superovulation.

Table 5. Statistical relation between sizes of ovaries before superovulatory treatment and ovarian structures after superovulatory treatment

| Before superovulatory treatment | Pearson correlation | After superovulatory treatment |        |       |             |       |        |
|---------------------------------|---------------------|--------------------------------|--------|-------|-------------|-------|--------|
|                                 |                     | Left ovary                     |        |       | Right ovary |       |        |
|                                 |                     | Size                           | F      | CL    | Size        | F     | CL     |
| Right ovary size                | r                   | 0.15                           | 0.58   | 0.055 | 0.648*      | 0.30  | 0.758* |
| Left ovary size                 | r                   | 0.430                          | 0.686* | 0.066 | 0.708**     | 0.597 | 0.723* |

row with \*\* coefficient of correlation significance ( $P < 0.005$ ); row with \* coefficient of correlation significance ( $P < 0.05$ ); F-follicle; CL-corpora luteum

According to the number of CL, the most effective superovulation was observed in Group 3 ovaries. The number of CL in the RSO and LSO after the superovulatory treatment depended on the group size. In Group 3 RSO, the number of CL ( $9.0 \pm 3.0$ ) was 2.3 ( $P < 0.05$ ) and 1.6 times greater in comparison with Group 1 and Group 2, respectively. The number of CL in the LSO was similar (mean 3.5 CL) in the first and second group, but in Group 3 the number ( $5.71 \pm 0.8$ ) of CL was 1.6 times greater compared with Group 1 and Group 2. The lowest number of F was observed in Group 2 in ovaries on both sides.

Table 6. Quantitative results of superovulation in relation to groups of ovaries before superovulatory treatment

| Ovaries groups | Left ovary        |                 | Right ovary     |                  |
|----------------|-------------------|-----------------|-----------------|------------------|
|                | F number          | CL number       | F number        | CL number        |
| No.1           | $3.50 \pm 0.5$    | $3.52 \pm 0.1$  | $6.30 \pm 0.1$  | $4.00 \pm 0.1^c$ |
| No.2           | $3.34 \pm 0.54^a$ | $3.57 \pm 0.88$ | $3.29 \pm 0.94$ | $5.67 \pm 1.2$   |
| No.3           | $4.40 \pm 0.1^b$  | $5.71 \pm 0.8$  | $4.12 \pm 2.02$ | $9.00 \pm 3.0^d$ |

a,b, c,d, columns with different superscript differ significance ( $P < 0.05$ ); F-follicle; CL-corpora luteum

It was established that the greatest statistical impact (significance 85 %,  $P < 0.05$ ) on the yield of embryos was demonstrated by CL found in the RSO after superovulation, whereas CL on the LSO demonstrated an almost 3 times smaller impact (significance 30 %,  $P < 0.05$ ). Thus, a statistically reliable and significant impact (significance 38 %,  $P < 0.05$ ) on the yield of embryos was demonstrated by CL in the RSO before superovulatory treatment (Table 7).

Table 7. Ovarian structures statistical significance to embryos yield

| Factor                                          | Significance (%) | P    |
|-------------------------------------------------|------------------|------|
| Right ovary corpus luteum after superovulation  | 85               | 0.03 |
| Left ovary corpus luteum after superovulation   | 30               | 0.04 |
| Right ovary corpus luteum before superovulation | 38               | 0.01 |
| Left ovary corpus luteum before superovulation  | 0                | 0    |
| Right ovary follicle before superovulation      | 21               | 0.02 |
| Left ovary follicle before superovulation       | 23               | 0.17 |

Multifactorial analysis. Ovarian structures are dependent variables and embryo yield - fixed factor.

As shown in Table 8, Group 3 ovaries had more F before superovulation. It was noted that the size of the ovary before superovulation had a direct effect on the yield of embryos and the number of transferable embryos. The largest number of embryos was obtained from Group 3 donors. The 3.6 times ( $P < 0.05$ ) larger number of embryos was obtained from Group 3 RSO donors ( $9.8 \pm 2.2$ ) compared with Group 1 RSO donors ( $2.7 \pm 0.5$ ) and 1.9 times more embryos compared with Group 2 RSO donors ( $5.2 \pm 1.2$ ). On the average, Group 3 RSO donors yielded 6.3 transferable embryos, which were 3.2 times ( $P < 0.05$ ) more compared with Group 1 RSO and 1.6 times more compared with Group 2 RSO donors.

Table 8. Differences between right ovary size and mean number of corpora lutea, mean number of follicles before superovulation and mean number of recovered embryos

| Groups by RSO | Mean number of CL ( $>10$ mm)/donor (unit) | Mean number of F ( $<10$ mm)/donor (unit) | Mean number of embryos recovered per donor (unit) | Mean number of transferable embryos recovered per donor (unit) |
|---------------|--------------------------------------------|-------------------------------------------|---------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------|
| No.1          | $1.0 \pm 0.1$                              | $1.6 \pm 0.6$                             | $2.7 \pm 0.5^a$                                   | $2.0 \pm 0.3^d$                                                |
| No.2          | $1.6 \pm 0.3$                              | $2.4 \pm 0.8$                             | $5.2 \pm 1.2^b$                                   | $3.9 \pm 0.4^e$                                                |
| No.3          | $1.25 \pm 0.3$                             | $3.3 \pm 1.1$                             | $9.8 \pm 2.2^c$                                   | $6.3 \pm 0.6^f$                                                |

a,c, d,f, columns with different superscript differ significance ( $P < 0.05$ ); a,b, d,e, b,c, e,f, columns with different superscript differ not significantly ( $P > 0.05$ )

## Discussion

A major limitation to the development of embryo production in cattle is the strong between-animal variability in ovulatory response to FSH-induced superovulation (RICO et al., 2009).

The superstimulatory response can be predicted by an ultrasound-based test of the ovaries (SINGH et al., 2004). Functional asymmetry of ovaries has been observed (SCHNEEBELI and DÖBELI, 1991).

ALVAREZ et al. (2005) noticed the asymmetry of ovarian function in their study on the impact of inbreeding on the ovary response to superovulation. A cow's embryo more often develops in the right uterine horn (GIRALDO et al., 2010). The asymmetry of cow reproduction physiology can be illustrated by the fact that embryos recovered from the right uterine horn are mostly male (HYLAN et al., 2009). According to the data of other authors, bilateral genital tract asymmetry in cows affects progesterone, proteins, and hexoses, without altering pregnancy rates (TRIGAL et al., 2013). We estimated that the right ovary was not only larger in its linear size but also that it reacts more actively to the superovulatory treatment with gonadotropins. Group 1 RSO were less frequently determined than Group 1 LSO. According to the size of ovaries after superovulation, Group 1 RSO donors demonstrated a 1.8 times weaker response to the superovulatory treatment compared with Group 3 RSO donors. According to the number of CL, Group 1 RSO donors showed a 2.3 times ( $P < 0.05$ ) weaker response to the superovulatory treatment in comparison with Group 3 RSO donors. Group 1 RSO (smaller than 668.0 mm<sup>2</sup>) were found in one third of all the selected donors. Small Group 1 ovaries on both sides signal a reasonable risk that the donor would demonstrate poor response to the superovulatory treatment, and yield a small number of embryos. The functional asymmetry needs to be taken into account for assessment of ovarian condition.

During the cycle of reproduction, follicles are constantly found in the ovaries (SIROIS and FORTUNE, 1988). The number of well expressed formations - CL and F - in an ovary depends on the growth of follicles. The population of ovarian F is a permanent formation present during the entire cycle of reproduction. Research has shown that the size of an ovary mostly depends on the number and size of F (SIROIS and FORTUNE, 1988). CUSHMAN et al. (1999) claimed that the ovarian response to the superovulatory treatment was dependent on the population of small follicles in the ovary.

It has been noted that the smaller the CL, the larger the F (LÜTTGENAU et al., 2011). It has been previously described that the response to gonadotropin superstimulation depends on the size of F: under the effect of chorionic gonadotropin, functional F (larger than 17.0 mm in diameter) mature and ovulate, whereas atretic F become luteinized (MONNIAUX et al., 1983). Meanwhile, KOHRAM and POORHAMDOLLAH (2012) found that ovaries with larger F (9.8 and 10.1 mm), found 4 days before superovulation, demonstrated a more active response to the superovulatory treatment and produced a larger number of good quality embryos.

The statistical significance of CL determined before superovulation for the yield of embryos may be explained as the significance of a physiological marker showing undisturbed steroid metabolism in cows. There is a high correlation between the diameter of CL and the plasma progesterone concentration (RIBADU et al., 1994). CL is also a signal showing that there is no dominating F in the ovaries of a healthy cow.

Development of F is also affected by high productivity of cows and negative energy balance (LUCY et al., 1992). According to MAPLETOFT et al. (2002), the response to the superovulatory treatment depends on the growth of F, which may be controlled with steroids.

Since it is known that progestogens inhibit the development of dominating F and stimulate a new wave of follicular growth, which contributes to the response to gonadotropin superstimulation (BO et al., 1995), only donors that had active CL larger than 10 mm and smaller than 10 mm F in their ovaries were selected as the donors for this study.

The size of the RSO and its ovarian formations before the superovulatory treatment are of special importance for prediction of the efficiency of the superovulatory treatment and the yield of embryos. For donors with average ovary areas (multiplied length and width) larger than 1112.0 mm<sup>2</sup>, well-developed CL in the RSO (at least 10.0 mm in size), and one F or several F (smaller than 10.0 mm) before superovulation, the chances for successful superovulatory response are 1.8 times greater by size of the ovaries and 2.3 times ( $P<0.05$ ) greater by number of CL after the superovulatory treatment, compared with the RSO smaller than 668.0 mm<sup>2</sup>.

The number embryos recovered from Group 3 RSO donors was 3.6 times ( $P<0.05$ ) larger compared with Group 1 RSO donors, and 1.9 times larger compared with Group 2 RSO donors. The donors with Group 3 RSO provided 3.2 times ( $P<0.05$ ) more transferable embryos compared with Group 1 RSO donors.

## References

- ALVAREZ, R. H., M. V. G. B. DA SILVA, J. B. P. DE CARVALHO, M. BINELLI (2005): Effects of inbreeding on ovarian responses and embryo production from superovulated Mantiqueira breed cows. *Theriogenology* 64, 1669-1676.
- BO, G. A., G. P. ADAMS, R. A. PIERSON, R. J. MAPLETOFT (1995): Exogenous control of follicular wave emergence in cattle. *Theriogenology* 43, 131-40.
- CABRERA, C., M. LANE, T. FARVER (2013): 210 factors affecting superovulation response in cattle: a retrospective study. *Reprod. Fertil. Dev.* 26, 219.
- CUSHMAN, R. A., J. C. DESOUZA, V. S. HEDGPETH, J. H. BRITT (1999): Superovulatory response of one ovary is related to the microandmacroscopic population of follicles in the contralateral ovary of the cow. *Biol. Reprod.* 60, 349-354.
- CUSHMAN, R. A., J. R. WOOD, R. G. SLATTERY, D. T. CLOPTON, J. SMITH, K. A. BEAVERS, W. E. POHLMEIER, J. W. BERGMAN, K. V. MOLINE, A. S. CUPP (2010): Reproductive aging influences ovarian function in beef cows. *Nebraska Beef Cattle Reports*, 558.
- GEREŠ, D., B. ŽEVRNJA, D. ŽUBČIĆ, R. ZOBEL, B. VULIĆ, N. STAKLAREVIĆ, K. GRACIN (2011): Asymmetrical functional activities of ovaries and tubular part of reproductive organs of dairy cows. *Vet. Arhiv* 81, 187-198.

- GIRALDO, A. M., D. HYLAN, K. R. BONDIOLI, R. A. GODKE (2010): Distribution of sexes within the left and right uterine horns of cattle. *Theriogenology* 73, 496-500.
- GRIZELJ, J., S. VINCE, M. SAMARDŽIJA, A. G. DE BULNES, T. DOVENSKI, L. TURMALAJ, B. ŽEVRNJA (2013): Use of ultrasonography to detect ovarian response in goats submitted to multiple ovulation and embryo transfer program. *Vet. Arhiv* 83, 125-134.
- HYLAN, D., A. M. GIRALDO, J. A. CARTER, G. T. GENTRY JR., K. R. BONDIOLI, R. A. GODKE (2009): Sex ratio of bovine embryos and calves originating from the left and right ovaries. *Biol. Reprod.* 81, 933-938.
- HELEIL, B., Y. EL DEEB (2010): Superovulatory response in relation to follicular dynamics and presence of dominant follicles in Egyptian Buffaloes. *Advan. Biol. Res.* 4, 169-174.
- KAYACIK, V., M. R. SALMANOĞLU, B. POLAT, A. ÖZLÜER (2005): Evaluation of the corpus luteum size throughout the cycle by ultrasonography and progesterone assay in cows. *Turk. J. Vet. Anim. Sci.* 29, 1311-1316.
- KOHRAM, H., M. POORHAMDOLLAH (2012): Relationships between the ovarian status and superovulatory responses in dairy cattle. *Anim. Reprod. Sci.* 131, 123-128.
- KUBOVIČOVÁ, E., A. A. MAKAREVIČ, L. STÁDNIK, R. HOLÁSEK, Z. HEGEDUŠOVÁ (2013): Effect of body condition and season on the yield and quality of cattle embryos. *J. Microbiol. Biotech. Food. Sci.* 2, 1426-1435.
- KUDLAČ, E., J. KONEČNY, J. ČERMAK (1991): Progesterone concentrations in milk of superovulated cows. *Acta. Vet. Brno* 60, 171-179.
- LAFRI, M., C. PONSART, M. NIBART, M. DURAND, A. MOREL, N. JEANGUYOT, F. BADINAND, K. DE MARI, P. HUMBLLOT (2002): Influence of CIDR treatment during superovulation on embryo production and hormonal patterns in cattle. *Theriogenology* 58, 1141-1151.
- LUCY, M. C., W. W. THATCHER, J. D. SAVIO, G. DANET-DESNOYERS, M. T. MOSER, L. BADINGA, F. A. SIMMEN, R. J. COLLIER (1992): Effect of bovine somatotropin on ovarian follicles, corpora lutea, and embryos during early pregnancy in cattle. *J. Anim. Sci.* 70, 3615-3626.
- LÜTTGENAU, J., N. BEINDORFF, S. E. ULBRICH, J. P. KASTELIC, H. BOLLWEIN (2011): Low plasma progesterone concentrations are accompanied by reduced luteal blood flow and increased size of the dominant follicle in dairy cows. *Theriogenology* 76, 12-22.
- MAILLO, V., D. RIZOS, U. BESENFELDER, V. HAVLICEK, A. K. KELLY, M. GARRETT, P. LONERGAN (2012): Influence of lactation on metabolic characteristics and embryo development in postpartum Holstein dairy cows. *J. Dairy. Sci.* 95, 3865-3876.
- MAPLETOFT, R. J., K. B. STEWARD, G. P. ADAMS (2002): Recent advances in the superovulation in cattle. *Reprod. Nutr. Dev.* 42, 601-611.
- MONNIAUX, D., D. CHUPIN, J. SAUMANDE (1983): Superovulatory responses of cattle. *Theriogenology* 19, 55-81.
- PENG, X., B. CAO, G. Z. DENG, C. Y. LI, L. L. YE, H. YU (2011): Echography characteristics of abnormal ovaries in infertile dairy cows. *J. Anim. Vet. Adv.* 10, 1166-1170.

- RIBADU, A. Y., W. R. WARD, H. DOBSON (1994): Comparative evaluation of ovarian structures in cattle by palpation per rectum, ultrasonography and plasma progesterone concentration. *Vet. Rec.* 135, 452-457.
- RICO, C., S. FABRE, C. MEDIGUE, N. DI CLEMENTE, F. CLEMENT, M. BONToux, J. L. TOUZE, M. DUPONT, E. BRIANT, B. REMY, J. F. BECKERS, D. MONNIAUX (2009): Anti-mullerian hormone is an endocrine marker of ovarian gonadotropin-responsive follicles and can help to predict superovulatory responses in the cow. *Biol. Reprod.* 80, 50-59.
- SCHATTEN, H., G. M. CONSTANTINESCU (2007): *Comparative Reproductive Biology*. Ames, Iowa, USA, pp. 171-212.
- SCHNEEBELI, J., M. DÖBELI (1991): The asymmetric distribution of ovarian functional structures in cattle. *Schweiz. Arch. Tierheilkd.* 133, 375-381.
- SEIDEL, G. E., R. P. ELSDEN JR., J. F. HASLER (2003): *Embryo Transfer in Dairy Cattle*. Hoard's Dairyman Book, Fort Atkinson, USA, pp. 96.
- SILVA-SANTOS, K. C., L. S. R. MARINHO, G. M. G. SANTOS, F. Z. MACHADO, S. M. GONZALEZ, L. A. LISBOA, M. M. SENEDA (2013): Ovarian follicle reserve: emerging concepts and applications. *Anim. Reprod.* 10, 180-186.
- SINGH, J., M. DOMINGUEZ, R. JAISWAL, G. P. ADAMS (2004): A simple ultrasound test to predict the superstimulatory response in cattle. *Theriogenology* 62, 227-243.
- SIROIS, J., J. E. FORTUNE (1988): Ovarian follicular dynamics during the estrous cycle in heifers monitored by real-time ultrasonography. *Biol. Reprod.* 39, 308-317.
- TAMADON, A., M. KAFI, M. SAEB, M. GHAVAMI (2011): Association of milk yield and body condition score indices with the commencement of luteal activity after parturition in high producing dairy cows. *Iran. J. Vet. Res.* 12, 184-191.
- TRIGAL, B., C. DIEZ, M. MUNOZ, J. N. CAAMANO, F. GOYACHE, E. CORREIA-ALVAREZ, F. J. CORRALES, M. I. MORA, S. CARROCERA, D. MARTIN, E. GOMEZ (2013): Elements of functional genital asymmetry in the cow. *Reprod. Fertil. Dev.* 26, 493-501.

Received: 20 October 2014

Accepted: 9 June 2015

**PALUBINSKAS, G., V. ŽILAITIS, V. JUOZAITIENĖ, L. LAUČIENĖ, V. JUODŽENTIS, A. GAVELIS, A. SEDEREVIČIUS: Superovulacijski odgovor prvog dana liječenja i njegova povezanost s veličinom i položajem jajnika kod visokoproduktivnih mliječnih krava. *Vet. arhiv* 86, 65-76, 2016.**

**SAŽETAK**

Cilj ovog istraživanja bio je utvrditi povezanost veličine, položaja i građe (folikuli F i žuto tijelo CL) jajnika prije superovulacijskog postupka te nakon superovulacijskog odgovora i dobivenih embrija. Kod 32 mliječne krave u tipu holštajna, superovulacija je provedena primjenom Pluset® (Laboratorios Calier, S.A., Barcelona, Španjolska). Tijekom 1. dana superovulacijskog postupka i oporavka embrija, jajnici davateljica bili su pretraženi ultrazvukom. S obzirom na veličinu jajnici su bili podijeljeni u tri skupine. Skupinu 2 činili su jajnici čija je veličina varirala od 668,0 do 1112,0 mm<sup>2</sup> (srednja vrijednost, 890,0 mm<sup>2</sup> ± 25 %), skupinu 1 (<668,0 mm<sup>2</sup>) činili su jajnici s više od 25 % manjom veličinom od skupine 2, a skupinu 3 jajnici (>1112,0

mm<sup>2</sup>) više od 25 % veći od jajnika skupine 2. Nakon postupka superovulacije, srednja veličina (3147,61 ± 106,6 mm<sup>2</sup>) desnih jajnika (DJ) bila je 27,3 % ( $P < 0,05$ ) veća nego srednja veličina lijevih jajnika (LJ). Neovisno od položaja, jajnici su nakon superovulacije bili povećani 3,2 puta, međutim povećanje je kod DJ, osim za skupinu 3, bilo 14 % izraženije ( $P > 0,05$ ) u usporedbi sa LJ. Najintenzivniji superovulacijski odgovor s obzirom na veličinu jajnika opažen je u skupini 1: kod DJ povećanje je bilo 5,5, a kod LJ 4,8 puta, ali s obzirom na apsolutne mjere, najveći porast opažen je u skupini 3 u kojoj su jajnici s obje strane povećani 2,4 puta. S obzirom na broj CL, skupina 1 DJ davateljica pokazala je 2,3 puta ( $P < 0,05$ ) slabiji superovulacijski odgovor u usporedbi sa skupinom 3 DJ davateljica. Broj dobivenih embrija (9,8 ± 2,2) bio je 3,6 puta ( $P < 0,05$ ) veći među davateljicama 3 DJ skupine prije superovulacije u usporedbi sa davateljicama skupine 1 DJ (2,7 ± 0,5). Kod krava skupine 3 DJ, broj prenosivih embrija (6,3 ± 0,6) bio je 3,2 puta ( $P < 0,05$ ) veći u usporedbi s kravama davateljicama skupine 1 DJ (2,0 ± 0,3). Žuta tijela u DJ su pokazala signifikantni utjecaj od 85 % ( $P < 0,05$ ) na dobivanje embrija u usporedbi sa samo 30 % ( $P < 0,05$ ) u LJ.

**Ključne riječi:** davateljice, krave, superovulacijski postupak, superovulacijski odgovor, broj embrija

## SUMMARY

### Introduction

Dairy industry is one of the most important branches of agriculture in Lithuania, having generated, for a number of years, at least one fifth of the total value of agricultural production in the whole country. Due to fluctuation of milk purchase prices, many milk producers in Lithuania have been lately working at a loss, therefore, in order to be competitive in the common market of the dairy sector, they are compelled to modernise technologically obsolete farms, improve the breeding value of dairy cows and increase their productivity.

In the current century owners of the worldwide most productive dairy herds in Israel, the USA and Canada focus on improvement of breeding activities rather than on cow feeding and maintaining technologies. Dairy producers in North America hold that transplantation of embryos is an integral part of improvement of the breeding value and productivity of dairy cows. In the US and Canadian breeding herds the highest amount of heifers are obtained as a result of embryo transplantation procedures.

For a number of years on average 700 000 transferable embryos have been worldwide collected *in vivo* yearly. Yet the widely varying and non-prognosticated effectiveness of superovulation is known to be one of major factors hindering a still wider application of this expensive technique for breeding genetically prospective cattle worldwide (Keller, Teepker, 1990; Kafi, McGowan, 1997). In his article (1984) Donaldson dwelled on the problem of unpredictability of the effectiveness of superovulation and stated that, out of 1263 donor cows, in 32.4% of cases no transferable embryo was recovered, and the share of all good embryos, i.e. the transferable ones, among all recovered embryos and unfertilised ovocytes amounted to 45%, on average.

After Tonhati et al. (1999) established that the response of an animal's body to superovulation is not inheritable and cannot be prognosticated according to previous results of superovulation, attempts were made to identify other factors that might influence the effectiveness of superovulation and the yield of transplantable embryos.

European researchers and embryo transplantation experts, being not able to administer estrogens to the donors for synchronisation of the growth of a new wave of follicles, attempt at solving the problem of unprognosticated superovulation response by a stricter selection of donors based on

ultrasound data oriented at a possibly highest number of follicles before ovulation (Mapletoft, Bó, 2012). This donor selection technique was scientifically substantiated in 2004 (Jaiswal et al., 2004; Singh et al., 2004).

However, in research literature insufficient data is available on what techniques could be used to assess or prognosticate the number of follicles that will start growing. Therefore, it is important to conduct more scientific studies in order to identify the basic indices of the ovary functional condition, which would enable to prognosticate, before ovulation, the prospective effectiveness of superovulation and the embryo yield.

Although in the past 30 years the yield of transferable embryos increased from on average 45% (Donaldson (1984)) to 60% (Hussein et al., 2014; Drillich et al., 2012), embryo transplantation experts and researchers inform that still at present a larger percentage of unfertilised ovocytes as well as poor quality, degenerated and untransferable embryos are often recovered (García Guerra et al., 2012). Thus, identification of embryo quality improving factors would enable to increase the yield of transferable embryos.

According to Blondin et al. (2012), ovocyte quality is influenced the most while it grows and matures in the liquid of the follicle. Hence, in order to increase their quality, we have to find efficient therapeutic or stimulation means that would impact ovocytes at this stage of development.

In the search for new, more efficient and natural techniques of treatment and prevention, discussions have increasingly been focused on the laser, a tool for light therapy, as a prospective and ecological treatment technique. Low intensity (up to 1500 mW) lasers (LIL) are most often used as physiotherapeutic equipment, whose light emitted in the living body is absorbed by different chematophores, enzymes, pigments, lipids, deoxyribonucleic acids (Chung et al., 2012).

In 1996 Wenbin et al. proved that laser *in vitro* effect on sperm leads to fermentation of fructose, intensified cell breathing processes, faster electron transport, higher consumption of phosphorus and absorption of calcium, and all these processes enhance the vitality and fertilising power of spermatozoids (Wenbin et al., 1996). A positive LIL stimulation effect on the reproduction function of animals was confirmed by facts published in 1915 proving that LIL ray waves with a typically photomodulative effect may be applied in the stimulation for activation of animals' sexual cells (spermatozoids and ovocytes), enhancement of fertilisation and in embryo production by using *in vitro* technique (Abdel – Salam, Harith, 2015). As in literature the amount of data about the effect of LIL radiation on the reproductive function of animals *in vivo* is scarce, the issue has to be explored and, upon receiving a positive result, the impact of such radiation

on the effectiveness of superovulation *in vivo*, embryo development, quality and yield is to be established.

With respect to the above ideas and assumptions, the aim and objectives of the study were formulated.

### **Aim and objectives**

**Aim:** to assess the importance of the size of dairy cow ovaries in the prognostication of superovulation results and the impact of LIL stimulation *in vivo* on the reproductive function of cows.

#### **Objectives:**

1. To investigate the effect of LIL stimulation *in vivo* on the indices of reproduction of dairy cows.
2. To establish the effect of LIL stimulation *in vivo* on the size of ovaries after superovulation, yield of corpora lutea (CL), follicles and embryos.
3. To assess the links between the ovary size, topographical position of ovaries before superovulation and the result of superovulation.
4. To determine the effect of LIL stimulation on the development and quality of embryos.

### **Scientific Innovativeness and Practical Importance of the Research**

The undertaken investigation has supported the approach that LIL stimulation is a promising and ecological technique of treatment and prevention. It was the first time in Lithuania and worldwide that the effect of LIL stimulation *in vivo* on the reproductive function of dairy cattle was assessed and its favourable effect on the effectiveness of superovulation and yield of transferable embryos was proved. The innovative method for the prognostication of the effectiveness of superovulation and embryo yield according to ovary size before superovulation will allow embryo transfer experts to reduce non-prognosticability of superovulation.

All this will bring about a huge practical economic benefit, as with decrease in non-prognosticability of superovulation and increase in the yield of transferable embryos, the costs of embryo transplantation will be markedly cut back, therefore this method will be more intensely and widely applied worldwide as an advanced, rapid and economical technique of breeding productive cattle.

## Methods employed in the study

This research study was performed from 2008 to 2015 at the Department of Anatomy and Physiology and the Animal Reproduction Laboratory of the Department of Non-communicable Diseases, at the Veterinary Academy of the Lithuanian University of Health Sciences. The study was conducted in two stages, two experiments were carried out.

**During the first stage of research** that lasted from 2008 to 2012 the first experiment was carried out to investigate *in vivo* the effect of LIL stimulation on reproduction indices of cows. The experiment was carried out at an agricultural company that kept 700 dairy cows. Lithuanian, Danish and German black white cows were investigated; they were 4 to 8 years old, of 2–6 lactations (n=270), the average productivity over the last lactation having been 6850 kg.

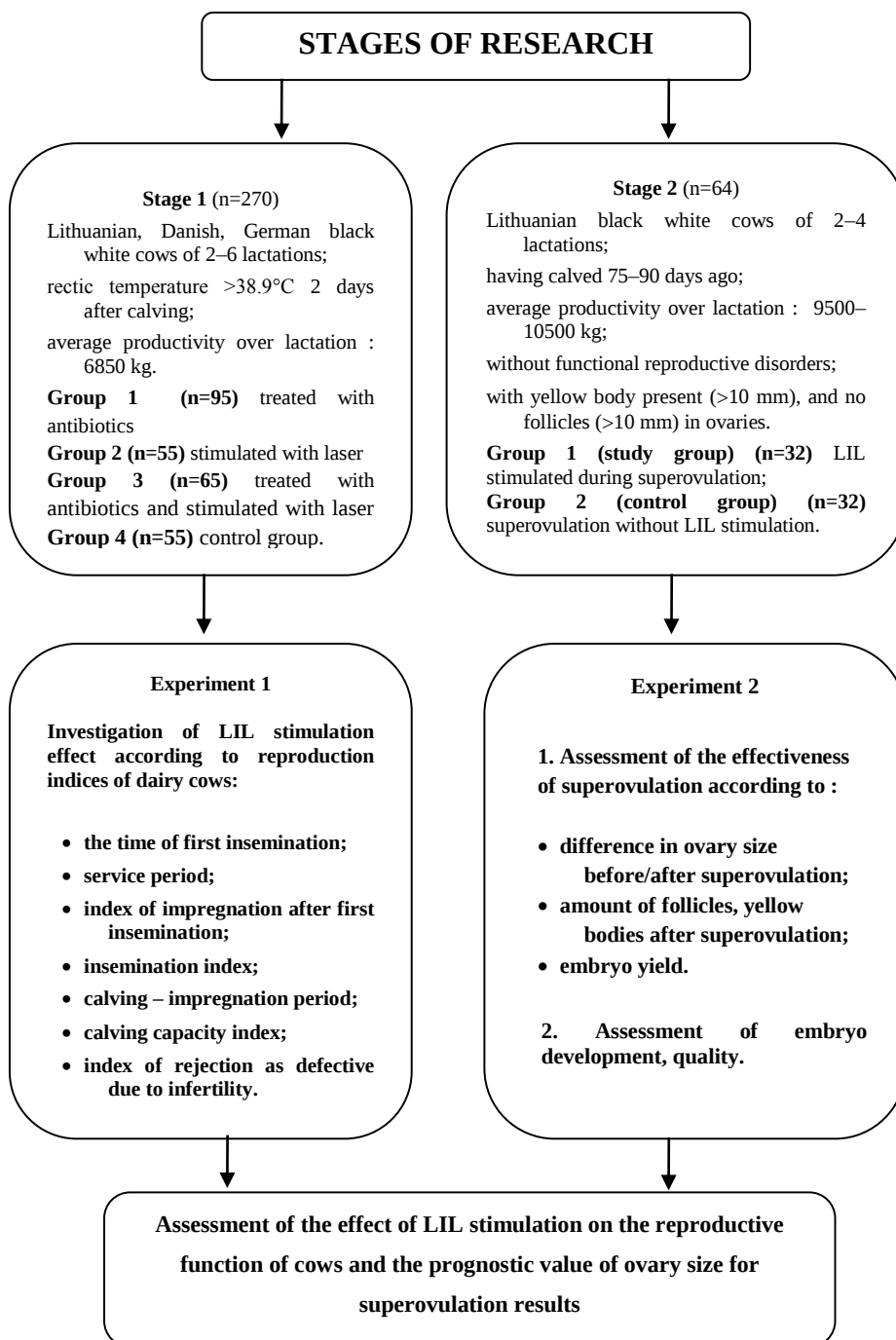
As during the experiment reproduction indices of cows that underwent LIL stimulation were compared to those of cows of the control group, a positive effect of LIL stimulation on the reproductive function of dairy cows was established, therefore research into the effect of LIL stimulation proceeded to the next stage.

**During the second stage of research** that lasted from 2013 to 2015 investigation of the effectiveness of superovulation and quality of embryos was performed in a breeding dairy herd of 400 black white Lithuanian cows. During the experiment clinically healthy Lithuanian black white cows were investigated, they were 4 to 6 years old, of 2–4 lactations (n=64) that had calved 75–90 days ago, whose average productivity over the last lactation had been 9500–10500 kg.

In the course of both stages of research cows were unrestrained, kept in cold cowsheds, and could drink from automatic dispensing facilities. Feeding was regular and did not change all year round, they were fed mixed fodder, chosen in respect of the physiological condition of the cows, dispensed from automatic tractor dispensers.

During the experiment links were established between the ovary size, the topographical position of ovaries before the onset of superovulation and the results of superovulation, and the effect of LIL stimulation on the effectiveness of superovulation, embryo quality and yield were assessed.

A schematic representation of the first and the second stages of research is provided in Fig. 1.



**Fig. 1.** Schematic representation of experiments carried out in the first and second stages of research

## **Methods Employed in the Experiment in the First Stage of Research**

Cows selected for the experiment had not had dystocia during calving and had a temperature higher than 38.9°C on the second day after calving.

Four study and control groups of cows were formed:

Group 1 – control positive group, treated with antibiotics (n=95);

Group 2 – study group stimulated with LIL (n=55);

Group 3 – study group treated with antibiotics and stimulated with LIL (n=65);

Group 4 – control negative group (n=55).

### **Assessment of the effect of LIL stimulation on the reproductive function of cows**

Cows assigned to the control positive group and group 3 were given intramuscular injection of 12 ml Excenel RTU (ceftiofur hydrochloride 50 mg/ml) on three consecutive days 2 to 4 days after calving. In cows of study groups 2 and 3 LIL stimulation of uterus and ovaries was performed by using laser equipment Laser STP-99 (country of origin – Russia), with 870–970 nm emitted light wavelength, 65,93 J/cm<sup>2</sup> power of radiation, 20 to 2000 Hz frequency range, about 1 sec. pulse duration. Stimulation was performed on 10 consecutive days from day 2 to day 11 after calving, once a day for 3 minutes, slowly altering the position of LIL equipment, stimulating the area of 40x50 cm (2000 cm<sup>2</sup>) of the sacral region, 5 cm away from the skin surface. Cows in the control negative group got intramuscular injection of 12 ml physiological 0.9 % sodium chloride solution on day 2 to 4 after calving.

In the study groups and control groups the method applied for metritis prevention is provided in Table 1.

**Table 1.** *Methods employed for prevention of metritis in study cows and control cows*

| Group No. | Group definition       | Number of studied cows (n) | Method for prevention of metritis                                                                                        |
|-----------|------------------------|----------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1         | Control positive group | 95                         | Excenel RTU 12 ml once a day, on 3 consecutive days                                                                      |
| 2         | Study group            | 55                         | LIL stimulation for 3 minutes once a day, on 10 consecutive days                                                         |
| 3         | Study group            | 65                         | Excenel RTU 12 ml once a day, on 3 consecutive days;<br>LIL stimulation for 3 minutes once a day, on 10 consecutive days |
| 4         | Control negative group | 55                         | Physiological 0.9 % sodium chloride solution 12 ml once a day, on 3 consecutive days                                     |

All experimental cows that had symptoms of clinical metritis on day 10–15 after calving were treated with preparations containing different antiseptic and antibacterial active substances. Veterinary preparations were injected once a day, every 7 days, and each time preparations containing different active substances were used. Cows with clinical metritis additionally received intramuscular injections of oestrophan and oxyton between injections of antiseptic and antibacterial preparations. Treatment lasted till uterus tonus recovered and purulent discharge from uterus stopped.

During the experiment the duration of metritis treatment (time from appearance of the first signs of metritis to disappearance of clinical symptoms) was recorded.

In the study and control groups the reproductive function of cows was evaluated according to reproduction indices fixed in software for herd management DairyPlan C21 (country of origin – Germany). Table 2 provides indices of reproduction and assessed values thereof.

**Table 2. Indices of reproduction and values thereof**

| No. | Reproduction indices                           | Units | Values of reproduction indices                      |
|-----|------------------------------------------------|-------|-----------------------------------------------------|
| 1.  | First time of insemination                     | Days  | Time period from calving to first insemination      |
| 2.  | Service period                                 | Days  | Time period from first insemination to impregnation |
| 3.  | Index of impregnation after first insemination | %     | Amount of impregnated cows after first insemination |
| 4.  | Insemination index                             | Times | Number of inseminations in one calving capacity     |
| 5.  | Calving – impregnation period                  | Days  | Time period from calving to impregnation            |
| 6.  | Calving capacity index                         | %     | Amount of cows with calving capacity                |
| 7.  | Index of rejection due to infertility          | %     | Amount of cows rejected due to infertility          |

### **Methods Employed in the Experiment at the Second Stage of Research**

The study cows (n=32) and control cows (n=32) were selected for the experiment after ultrasound testing of their uterus and ovaries. Ovaries were investigated by using ultrasound scanner Digital Diagnostic Ultrasound Devices (model – HG 9300) manufactured by Caresono Technology Co., China, Ltd., at 7 Mhz frequency, by using a linear rectic transformer.

Ultrasound testing was used to confirm that involution of uterus had completed, there was no inflammatory liquid in uterus, there were no cysts or any other pathology in ovaries and no commissures or inflammatory processes in fallopian tubes. Only clinically healthy cows were selected for the experiment, those that had no functional reproductive disorders, whose ovaries contained no CL bigger than 10 mm and no follicles bigger than 10 mm.

Ultrasound testing was used to measure ovary width, length and the amount of derivatives (CL and follicles), The size (area) of ovaries was assessed by multiplying width by length, thus the average sizes of ovaries of the study cows and the control cows before superovulation was calculated.

With reference to the average prevailing right ovary size (987.63 mm<sup>2</sup>), all cows of the study and control groups were assigned to 3 groups (Table 3).

**Table 3.** Groups of cows according to the prevailing right ovary size before superovulation

| Group of cows                                   | Right ovary size before superovulation (mm <sup>2</sup> ) |
|-------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------|
| <b>1</b><br>(cows with small ovaries)           | <b>&lt; 741.0</b><br>(987.63 mm <sup>2</sup> - 25 %)      |
| <b>2</b><br>(cows with ovaries of average size) | <b>741.0 – 1235.0</b><br>(987.63 mm <sup>2</sup> ± 25 %)  |
| <b>3</b><br>(cows with big ovaries)             | <b>&gt; 1235.0</b><br>(987.63 mm <sup>2</sup> + 25 %)     |

### Methods employed to cause superovulation without LIL stimulation

In the control groups superovulation without LIL stimulation in cows (n=32) was caused by preparation PLUSET (Laboratorios Calier, S.A., Barcelona, Spain) obtained from pig's hypophysis containing a hormone that stimulates follicles (FSH) and a luteinising hormone (LH) at the ratio 1:1.

Superovulation was induced according to the superovulatory treatment protocol (Lafria et al., 2002; Seidel et al., 2003) provided in Table 4, with no regard to the phase of the sexual cycle of cows.

One millilitre of the preparation contained 35 VV FSH and LH. The total dose of preparation PLUSET amounted to 700 VV FSH and LH per one investigated cow.

After 168 hours following the first insemination (on day 18–19 according to the superovulation protocol) embryos were recovered nonsurgically. The superovulatory treatment protocol is provided in Table 4.

**Table 4. Superovulatory treatment of donors**

| No | Days of superovulation |         | Procedures performed                                                               |
|----|------------------------|---------|------------------------------------------------------------------------------------|
| 1. | Day 1                  |         | Introduction of intravaginal implant CIDR containing 1.38 g of progesterone        |
| 2. | Day 6                  | Morning | I.m. injection of 4 ml of Pluset 140 IU                                            |
|    |                        | Evening | I.m. injection of 4 ml of Pluset 140 IU                                            |
| 3. | Day 7                  | Morning | I.m. injection of 3 ml of Pluset 105 IU                                            |
|    |                        | Evening | I.m. injection of 3 ml of Pluset 105 IU                                            |
| 4. | Day 8                  | Morning | I.m. injection of:<br>- 2 ml of Cloprostenol<br>- 2 ml of Pluset 70 IU             |
|    |                        | Evening | I.m. injection of:<br>- 2 ml of Cloprostenol<br>- 2 ml of Pluset 70 IU             |
| 5. | Day 9                  | Morning | - removal of intravaginal implant CIDR<br>- i.m. injection of 1 ml of Pluset 35 IU |
|    |                        | Evening | I.m. injection of 1 ml of Pluset 35 IU                                             |
| 6. | Days 10–11             |         | Artificial insemination                                                            |
| 7. | Day 18                 |         | Embryo recovery                                                                    |

### Methods employed to cause superovulation by LIL stimulation

Superovulation by LIL stimulation was caused in cows of the study groups (n=32) with reference to the superovulatory treatment protocol (See Table 4), and embryos were recovered nonsurgically.

When inducing superovulation, cows of the study groups were additionally subjected to ovary stimulation by using laser equipment Laser STP-99, with 870–970 nm emitted light wavelength, 65.93 J/cm<sup>2</sup> radiation power, frequency range from 20 to 2000 Hz, about 1 sec. pulse duration.

LIL stimulation of the ovaries of study cows *in vivo* was started from the first day of superovulatory treatment by 3 minutes of stimulation once a day, on 10 days consecutive days. Stimulation was performed by slowly altering the position of the equipment stimulating the area of 40x50 cm (2000 cm<sup>2</sup>) of the sacral region, 5 cm away from the skin surface. Final LIL stimulation was performed at estrus one hour after insemination.

### Assessment of the effectiveness of superovulation

The effectiveness of superovulation in the study groups and control groups was assessed on day 18–19 of the superovulation protocol (See Table 4) during embryo recovery in order to establish:

- LIL stimulation *in vivo* effect on superovulation;

- links between ovary size, topographical position of ovaries before superovulation and superovulation results.

Investigation of the effect of LIL stimulation on the effectiveness of superovulation was performed by analyzing and comparing in between indices of superovulation effectiveness of cows in the study groups and those in the control groups:

1. Difference in ovary size before/after superovulation;
2. Number of follicles and yellow bodies after superovulation;
3. Embryo yield.

### **Assessment of embryo development, quality and yield**

The impact of LIL stimulation on the development, quality and yield of embryos in the study groups and the control groups was assessed on day 18-19 of superovulation protocol during recovery of embryos.

The quality of recovered embryos was assessed basing on the embryo quality assessment technique suggested by Bó and Mapletoft (2013), whereby embryos were classified according to a system of digital codes in respect of the stage of development (stage 1 to 9) and quality (class 1 to 4). Assessment of the quality of cattle embryos was carried out by using 45x factor stereo microscope (Stereo-zoom microscope, with phototube, factor 7x–45x, Minitube, Germany).

### **Statistical Assessment of Data**

Data of experiments of studies were analyzed by using SPSS software (SPSS for Windows 15, SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Results were held statistically significant at  $p \leq 0.05$ .

For data analysis, descriptive and multifactor statistics (ANOVA) and Spearman correlative matrix were used. Arithmetic means of quantitative variables ( $\bar{x}$ ), errors of arithmetic means ( $m_x$ ) and squared deviations from the mean ( $\sigma$ ) were calculated. Student's test was used to establish statistical significance ( $p$ ) of arithmetic means of quantitative variables (Juozaityenė, Kerzienė, 2001).

## **Results**

### **The effects of LIL stimulation on the reproductive function in cows**

The greatest number of cows with metritis (over 65 %) was identified in negative control group IV and the smallest number in experimental group III

of cows treated with antibiotics and stimulated with LIL (58.4 %). Yet the obtained results showed that the difference of metritis incidence between the experimental and control cows was statistically insignificant ( $p=0.705$ ).

The shortest average curing time of cows with metritis was determined in group III of cows treated with antibiotics and stimulated with LIL. It was by 62.6 % ( $p=0.05$ ) shorter than in negative control group IV, by 13.8 % shorter than in positive control group I and by 57.7 % ( $p=0.05$ ) shorter than in experimental group II.

### **Analysis of reproductive indices of experimental and control cows**

The average period between calving and the first conception was longest in positive control group I and in negative control group IV. The shortest period was in experimental group III: on the average by 34.7 % (16 days) shorter than in negative control group IV and by 36.9 % (17 days) shorter ( $p=0.05$ ) than in negative control group I.

A positive effect of LIL stimulation was determined by comparison of service periods of cows in control and experimental groups. The most marked effect of LIL stimulation according to the service period was established in experimental group III. The average service period in this group of cows was respectively by 44.4 % (18.9 days) ( $p=0.05$ ) and 41.3 % (17.6 days) ( $p=0.05$ ) shorter than in negative control group IV and positive control group I and by 10.8 % (4.6 days) ( $p=0.05$ ) shorter than in experimental group II.

The index of first conception in positive control group I and experimental group II was uniform. It was by 9.5 % ( $p=0.05$ ) higher than in negative control group IV but by 10.9 % ( $p=0.05$ ) lower than in experimental group III. The most marked effect of LIL stimulation on the indices of conception after first insemination was established by comparison of the data from experimental group III and negative control group IV. This index in experimental group III even was by 21.4 % ( $p=0.05$ ) higher than in negative control group of cows.

Stimulation with LIL had a positive yet statistically unreliable effect on the insemination index. In both experimental groups of cows, the insemination index was lower than in negative control group IV and positive control group I. The strongest positive effect of LIL stimulation according to the insemination index was observed in experimental group III. In comparison with control negative group IV and control positive group I, the insemination index in experimental group III was lower by 30 % ( $p>0.05$ ) and 20 % ( $p=0.05$ ) respectively.

A statistically significant effect of stimulation with LIL was established for the calving-conception period, which was almost equal in both control groups of cows but considerably longer than in experimental groups III and II. The strongest positive effect of stimulation with LIL was established in experimental group III where the service period was by 34.17 % (31.4 days,  $p<0.05$ ) shorter than in positive control group I and by 34.39 % (31.6 days,  $p<0.05$ ) shorter than in control negative group IV.

The biggest number of cows with an optimal 80–100-days service period was established in experimental group III. In this group not a single case of service period longer than 160 days was established. The smallest number of cows with service period shorter than 100 days was established in control negative group IV.

The calving indices in the experimental and control groups of cows were almost equal (the difference accounted for 3 %). During the trial, no statistically significant correlation ( $p=0.904$ ) between the calving index of experimental and control groups of cows was established.

The index of culling due to reproductive disorders (which appeared after the last calving) was highest in negative control group IV. During the experiment, the smallest number of cows to be culled due to reproductive disorders was in experimental group III. Yet no statistically significant correlation ( $p=0.701$ ) between the experimental and control groups of cows and culling index due to low reproductive performance was established.

Analysis of the data from experimental and control groups of cows also showed a positive effect of stimulation with LIL. In comparison with control negative group IV, the cows of both experimental groups preventively stimulated with LIL had fewer cases of mastitis, uterine atony and digestive disorders: by 21.1 % ( $p<0.05$ ) fewer in experimental group II and by 27.5 % ( $p<0.05$ ) fewer in experimental group III.

### **Efficiency of superovulation according to the size of ovary before and after superovulation**

The average size of the left-side ovaries in experimental (stimulated with LIL during superovulation) and control (superovulation induced without LIL stimulation) cows before superovulation was by 24.7 % ( $p<0.05$ ) smaller than the average size of the right-side ovaries.

The average size of the right-side ovaries before superovulation was by 22.8 % ( $p<0.05$ ) bigger in experimental cows and by 26.6 % ( $p<0.05$ ) bigger in control cows than the average size of left-side ovaries in experimental and control cows.

The ovarian asymmetry in experimental and control groups of cows persisted after superovulation. The average size of right ovaries of experimental cows after superovulation was by 21.4 % ( $p<0.001$ ) bigger than the average size of left ovaries whereas the difference between the right and left ovaries in control cows was by 6 % more marked and accounted for 27.3 % ( $p<0.01$ ). Irrespective of the topographic position, the size of the ovaries of experimental cows after superovulation increased by 2.9 ( $p<0.001$ ) times on the average. The response of the ovaries of control cows to superovulation was by 16.5 % more intensive; they increased by 3.2 times on the average ( $p<0.001$ ).

The enlargement response of the right ovaries of cows from group III, who most intensively responded to superovulation, was by 91.8 % ( $p<0.001$ ) stronger than the enlargement response of the left ovaries of cows from control group II, whose response to superovulation was weakest.

Comparison of ovary responses to superovulation in experimental and control groups of cows according to the size ( $\text{mm}^2$ ) of ovaries before and after superovulation showed that the response of the ovaries of control cows was by 16.5 % ( $p<0.001$ ) stronger.

It was determined that the size of ovaries of experimental and control cows before superovulation strongly and statistically significantly correlate with the size of ovaries after superovulation. The size of the right ovaries of experimental and control cows before superovulation is by 3.2 % ( $p<0.01$ ) and 4.7 % ( $p<0.01$ ) more strongly correlated with the size of the right ovaries of experimental and control cows than with the left ones after superovulation.

#### **The efficiency of superovulation according to the number of follicles and CL after superovulation**

After superovulation, the average number of follicles in the left ovary by 20.12 % ( $p<0.05$ ) exceeded the average number of follicles in the right ovary of experimental cows and was by 26.29 % ( $p<0.05$ ) smaller than the average number of follicles in the right ovary of control cows.

In the experimental groups of cows, the number of follicles was on the average by 12.1 % ( $p>0.05$ ) smaller than in the control groups.

The statistical correlations between the size of experimental and control cow ovaries before superovulation and the number of follicles after superovulation were weak. The bigger is the size of the left or right ovaries of experimental and control cows before superovulation the greater is the number of follicles in the left and the smaller is the number in the

right ovary after superovulation. This trend in the group of control cows is statistically reliable.

The average number of CL in the right ovaries of experimental and control cows after superovulation exceeded the average number of CL in the left ovaries by 60 % ( $p<0.001$ ) in the experimental groups and by 44.5 % ( $p<0.01$ ) in the control groups respectively. After superovulation, the average number of CL in the right ovaries of experimental and control cows exceeded the average number of CL in the left ovaries. A trend was established that the bigger is the right ovary before superovulation the greater will be the number of CL in it after superovulation (Table 1).

**Table 5.** The number of CL in the left and right ovaries of experimental and control groups of cows after superovulation

| Groups of cows         | Experimental cows              |                                 | Control cows                   |                                |
|------------------------|--------------------------------|---------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|
|                        | Left ovary                     | Right ovary                     | Left ovary                     | Right ovary                    |
|                        | $\bar{x} \pm m_x, \sigma$      | $\bar{x} \pm m_x, \sigma$       | $\bar{x} \pm m_x, \sigma$      | $\bar{x} \pm m_x, \sigma$      |
| <b>group I</b>         | 4.29±0.51 <sup>a</sup><br>1.90 | 5.93±0.80 <sup>f</sup><br>3.00  | 3.50±0.23 <sup>j</sup><br>0.80 | 4.00±0.48 <sup>o</sup><br>1.65 |
| <b>group II</b>        | 3.83±0.78 <sup>b</sup><br>2.69 | 7.33±0.43 <sup>g</sup><br>1.50  | 3.54±0.72 <sup>k</sup><br>2.60 | 6.00±0.54 <sup>p</sup><br>1.96 |
| <b>group III</b>       | 6.50±0.76 <sup>c</sup><br>1.87 | 10.17±1.25 <sup>h</sup><br>3.06 | 5.71±0.61 <sup>l</sup><br>1.60 | 8.43±1.23 <sup>r</sup><br>3.26 |
| <b>Average</b>         | 4.53±0.42 <sup>d</sup><br>2.37 | 7.25±0.52 <sup>i</sup><br>2.92  | 4.00±0.36 <sup>m</sup><br>2.05 | 5.78±0.48 <sup>s</sup><br>2.71 |
| <b>Average per cow</b> | 5.89±0.37 <sup>e</sup><br>2.97 |                                 | 4.89±0.32 <sup>n</sup><br>2.55 |                                |

( $p<0.001$ ) – d:i; ( $p<0.01$ ) – m:s, b:g, j:l; ( $p<0.05$ ) – k:p, c:h, i:s, o:p, o:r, k:l, a:c, f:h, b:c, e:n

It was determined that the size of the left and right ovaries of experimental and control cows before and after superovulation moderately and statistically significantly correlated with the number of CL after superovulation in the right ovaries of experimental cows and in the left and right ovaries of control cows.

### The efficiency of superovulation according to the embryo yield

The greatest number of embryos was flushed from cows with the biggest ovaries before superovulation from experimental group III and control group. The average number of flushed embryos suitable for transfer in

experimental group III was respectively by 61.7 % ( $p<0.001$ ) and 47.4 % ( $p>0.05$ ) greater than in experimental group II and by 194.8 % ( $p<0.001$ ) and 150.9 % ( $p<0.01$ ) greater than in experimental group I.

The number of embryos flushed from experimental cows exceeded the number of flushed embryos from control cows by 29 % ( $p<0.05$ ) on the average and the number of embryos suitable for transfer also was by 15.9 % ( $p>0.05$ ) greater. In all cases, the number of flushed and suitable for transfer embryos was greater in the experimental groups of cows than in the control groups (Table 6).

**Table 6.** The average number of flushed and suitable for transfer embryos from experimental and control cows

| Groups of cows   | Experimental cows                           |                                             | Control cows                                |                                             |
|------------------|---------------------------------------------|---------------------------------------------|---------------------------------------------|---------------------------------------------|
|                  | Number of flushed embryos                   | Embryos suitable for transfer               | Number of flushed embryos                   | Embryos suitable for transfer               |
|                  | $\bar{x} \pm m_x; \sigma$                   | $\bar{x} \pm m_x; \sigma$                   | $\bar{x} \pm m_x; \sigma$                   | $\bar{x} \pm m_x; \sigma$                   |
| <b>group I</b>   | 4.07±0.25 <sup>a</sup><br>0.92              | 2.79±0.32 <sup>e</sup><br>1.19              | 2.67±0.36 <sup>i</sup><br>1.23              | 2.00±0.44 <sup>m</sup><br>1.54              |
| <b>group II</b>  | 7.42±0.29 <sup>b</sup><br>1.00              | 4.75±0.68 <sup>f</sup><br>2.34              | 5.23±0.38 <sup>j</sup><br>1.36              | 3.92±0.55 <sup>n</sup><br>1.98              |
| <b>group III</b> | 12.0±0.68 <sup>c</sup><br>1.67              | 7.00±0.86 <sup>g</sup><br>2.10              | 9.86±0.34 <sup>k</sup><br>0.90              | 6.29±0.71 <sup>o</sup><br>1.89              |
| <b>Avg.</b>      | <b>6.81±0.56<sup>d</sup></b><br><b>3.15</b> | <b>4.31±0.42<sup>h</sup></b><br><b>2.40</b> | <b>5.28±0.52<sup>l</sup></b><br><b>2.96</b> | <b>3.72±0.42<sup>p</sup></b><br><b>2.39</b> |

( $p<0.001$ ) – d:h; i:j, i:k, j:k, m:o, a:b, a:c, b:c; ( $p<0.01$ ) – k:o, a:e, b:f, c:g, e:g;

( $p<0.05$ ) – e:p, d:l, m:n, n:o, e:f.

The size of the right and left ovaries in experimental and control cows before superovulation strongly and statistically significantly correlated with the number of flushed embryos from experimental cows and flushed and suitable for transfer embryos from control cows after superovulation. Meanwhile, the statistical correlation between the experimental cows and the number of embryos suitable for transfer is moderate and statistically significant.

### Embryo development stages and quality

The greatest number of embryos flushed from experimental and control groups of cows were compact morula stage embryos. The smallest number of flushed embryos from experimental cows were unfertilized oocytes and the smallest number of flushed embryos from control cows were of

blastocyst stage. The fact that fewer compact morulae and a greater number of early blastocysts and blastocyst stage embryos were flushed from experimental groups of cows than from control groups of cows indicates that ovary stimulation with LIL during superovulation synchronizes (puts forward and equalizes) the oocyte maturation and ovulation process.

The average numbers of embryos of different development stages in experimental and control groups of cows on the 7<sup>th</sup> day after insemination are given in Table 7.

**Table 7.** The average number of embryos of different development stages from experimental and control cows on the 7<sup>th</sup> day after insemination

| Groups of cows | Embryo development stages  |                         |                            |                         |                            |                         |                            |                          |
|----------------|----------------------------|-------------------------|----------------------------|-------------------------|----------------------------|-------------------------|----------------------------|--------------------------|
|                | Unfertilized oocyte        |                         | Compact morula             |                         | Early blastocyst           |                         | Blastocyst                 |                          |
|                | $\bar{x}; \pm m_x; \sigma$ |                         | $\bar{x}; \pm m_x; \sigma$ |                         | $\bar{x}; \pm m_x; \sigma$ |                         | $\bar{x}; \pm m_x; \sigma$ |                          |
|                | T                          | K                       | T                          | K                       | T                          | K                       | T                          | K                        |
| <b>I</b>       | <b>0.50<sup>a</sup></b>    | <b>0.42<sup>e</sup></b> | <b>1.21<sup>i</sup></b>    | <b>1.50<sup>m</sup></b> | <b>1.57<sup>r</sup></b>    | <b>0.67<sup>u</sup></b> | <b>0.79<sup>a1</sup></b>   | <b>0.08<sup>e1</sup></b> |
|                | $\pm 0.14$                 | $\pm 0.19$              | $\pm 0.19$                 | $\pm 0.29$              | $\pm 0.29$                 | $\pm 0.26$              | $\pm 0.26$                 | $\pm 0.08$               |
|                | 0.52                       | 0.67                    | 0.70                       | 1.00                    | 1.09                       | 0.89                    | 0.97                       | 0.29                     |
| <b>II</b>      | <b>1.08<sup>b</sup></b>    | <b>0.77<sup>f</sup></b> | <b>2.50<sup>j</sup></b>    | <b>2.08<sup>n</sup></b> | <b>2.50<sup>s</sup></b>    | <b>1.54<sup>v</sup></b> | <b>1.33<sup>b1</sup></b>   | <b>0.85<sup>f1</sup></b> |
|                | $\pm 0.19$                 | $\pm 0.26$              | $\pm 0.51$                 | $\pm 0.33$              | $\pm 0.36$                 | $\pm 0.22$              | $\pm 0.40$                 | $\pm 0.41$               |
|                | 0.67                       | 0.93                    | 1.78                       | 1.19                    | 1.24                       | 0.78                    | 1.37                       | 1.46                     |
| <b>III</b>     | <b>2.17<sup>c</sup></b>    | <b>2.00<sup>g</sup></b> | <b>5.00<sup>k</sup></b>    | <b>3.71<sup>o</sup></b> | <b>3.00<sup>š</sup></b>    | <b>2.57<sup>z</sup></b> | <b>1.83<sup>c1</sup></b>   | <b>1.57<sup>g1</sup></b> |
|                | $\pm 0.60$                 | $\pm 0.62$              | $\pm 0.52$                 | $\pm 0.52$              | $\pm 0.63$                 | $\pm 0.48$              | $\pm 0.40$                 | $\pm 0.30$               |
|                | 1.47                       | 1.63                    | 1.26                       | 1.38                    | 1.55                       | 1.27                    | 0.98                       | 0.79                     |
| <b>Avg.</b>    | <b>1.03<sup>d</sup></b>    | <b>0.91<sup>h</sup></b> | <b>2.41<sup>l</sup></b>    | <b>2.22<sup>p</sup></b> | <b>2.19<sup>t</sup></b>    | <b>1.44<sup>ž</sup></b> | <b>1.19<sup>d1</sup></b>   | <b>0.72<sup>h1</sup></b> |
|                | $\pm 0.18$                 | $\pm 0.21$              | $\pm 0.33$                 | $\pm 0.25$              | $\pm 0.24$                 | $\pm 0.21$              | $\pm 0.21$                 | $\pm 0.20$               |
|                | 1.00                       | 1.17                    | 1.88                       | 1.41                    | 1.33                       | 1.16                    | 1.18                       | 1.14                     |

(**p<0.001**) – p:h1, d:l, d:t, h:p, i:k; (**p<0.01**) – e:d1, j:k, m:o, u:z, l:t, t:d1, e1:g1;

(**p<0.05**) – ž:h1, t:ž, r:u, a:l:e1, s:v, a:b, a:c, i:j, a1:c1, e:g, n:o, p:ž, u:v

T – Experimental cows; K – Control cows

The majority of embryos flushed from experimental and control cows were of grade 2 (satisfactory). A positive effect of stimulation with LIL is observable by comparison of the number of highest (grade 1) and lowest

(grade 4; unfertilized and degenerated oocytes) quality embryos flushed from experimental and control cows.

A manifest effect of stimulation with LIL is obvious from comparison of the average numbers of grade 1 embryos flushed from experimental and control groups of cows. The embryos of grade 1 quality from experimental groups II and I exceeded the number of this kind of embryos from analogous control groups by 158.0 % ( $p>0.05$ ) and 92.6 % ( $p<0.05$ ) respectively (Table 8).

**Table 8.** The average number of embryos of different quality grades from experimental and control groups of cows

| Groups of cows | Quality grades of embryos               |                                         |                                         |                                         |                                         |                                         |                                         |                                         |
|----------------|-----------------------------------------|-----------------------------------------|-----------------------------------------|-----------------------------------------|-----------------------------------------|-----------------------------------------|-----------------------------------------|-----------------------------------------|
|                | Grade 1<br>(excellent)                  |                                         | Grade 2<br>(satisfactory)               |                                         | Grade 3<br>(bad)                        |                                         | Grade 4<br>(dead or degenerated)        |                                         |
|                | $\bar{x}; \pm m_x; \sigma$              |                                         | $\bar{x}; \pm m_x; \sigma$              |                                         | $\bar{x}; \pm m_x; \sigma$              |                                         | $\bar{x}; \pm m_x; \sigma$              |                                         |
|                | T                                       | K                                       | T                                       | K                                       | T                                       | K                                       | T                                       | K                                       |
| I              | 1.14 <sup>a</sup><br>$\pm 0.23$<br>0.86 | 0.50 <sup>d</sup><br>$\pm 0.23$<br>0.80 | 1.64 <sup>s</sup><br>$\pm 0.17$<br>0.63 | 1.50 <sup>i</sup><br>$\pm 0.31$<br>1.09 | 0.79<br>$\pm 0.26$<br>0.97              | 0.25<br>$\pm 0.13$<br>0.45              | 0.50 <sup>n</sup><br>$\pm 0.14$<br>0.52 | 0.42 <sup>r</sup><br>$\pm 0.19$<br>0.67 |
| II             | 2.08 <sup>b</sup><br>$\pm 0.34$<br>1.16 | 1.08 <sup>e</sup><br>$\pm 0.26$<br>0.95 | 2.67<br>$\pm 0.48$<br>1.67              | 2.85 <sup>j</sup><br>$\pm 0.41$<br>1.46 | 1.58<br>$\pm 0.48$<br>1.68              | 0.54<br>$\pm 0.27$<br>0.97              | 1.08 <sup>o</sup><br>$\pm 0.19$<br>0.67 | 0.77<br>$\pm 0.26$<br>0.93              |
| III            | 2.50 <sup>c</sup><br>$\pm 0.22$<br>0.55 | 2.57 <sup>f</sup><br>$\pm 0.57$<br>1.51 | 4.50 <sup>h</sup><br>$\pm 0.89$<br>2.17 | 3.71 <sup>k</sup><br>$\pm 0.29$<br>0.76 | 2.83<br>$\pm 1.08$<br>2.64              | 1.57<br>$\pm 0.57$<br>1.51              | 2.17 <sup>p</sup><br>$\pm 0.60$<br>1.47 | 2.00 <sup>s</sup><br>$\pm 0.62$<br>1.63 |
| Avg.           | 1.75<br>$\pm 0.19$<br>1.08              | 1.19<br>$\pm 0.23$<br>1.28              | 2.56<br>$\pm 0.31$<br>1.74              | 2.53<br>$\pm 0.26$<br>1.46              | 1.47 <sup>i</sup><br>$\pm 0.31$<br>1.76 | 0.66 <sup>m</sup><br>$\pm 0.19$<br>1.07 | 1.03<br>$\pm 0.18$<br>1.00              | 0.91<br>$\pm 0.21$<br>1.17              |

( $p<0.001$ ) – a:c; ( $p<0.01$ ) – d:f; ( $p<0.05$ ) – l:m, b:e, r:s, i:j, i:k, e:f, n:o, n:p, g:h, a:b;

T – Experimental cows; K – Control cows

## Discussion

The time after calving (*pp* – *post partum*) has a direct and long-term impact on cows' health. Calving is a complex physiological process in cows during which neuroendocrine system, metabolism and physiology of reproductive organs are strongly affected. At this time, the regulatory and resistance systems in cows can be easily disrupted. This is why after calving cows develop metabolic diseases or inflammation of the mammary gland or uterus (metritis). After calving, the latter disease occurs in 25–83.3 % of cows. In the Lithuanian farms, the prevalence of metritis in cows is 11 % and in some large farms even 33.2–48.6 % (Špakauskas et al., 2005). The

probability of developing metritis depends on the immune response of cows to microorganisms and species and number of bacteria associated with metritis.

It was determined that temperature higher than +39°C in the early *pp* stage is indicative of inflammation of the uterus (Palenik et al., 2009). Therefore, a common practice is to apply antibiotic therapy to cows with temperature exceeding +39°C as a preventive measure in the early days *pp*. Kristula and colleagues (2001) suggest that during the 10 days of the early *pp* period the temperature in healthy cows does not exceed +38.9°C. A higher rectal temperature caused by metritis usually is observed on the 3<sup>d</sup>–6<sup>th</sup> days *pp* (Benzaquen et al., 2007).

Strengthening of the immune system is the most promising preventive method against uterine diseases. In the light of recently popular ecological approach, efforts are put to find more efficient ecological therapy methods including the light therapy. Treatment with laser is based on the exposure of biological objects to light emitted by high and low intensity lasers (Calin, Coman, 2011). Depending on the wavelength, the energy generated by lasers penetrates the exposed tissue at a different depth. The prophylactic use of laser in metritis therapy is associated with Zhevago and her colleagues' (2006) observations that light can be a useful therapeutic method to regulate the cell immunity.

The results obtained during the present investigation support the findings of other authors about the positive LIL stimulation effect on immune system. In our opinion, namely the groups of cows stimulated with LIL stimulation and treated with antibiotics had respectively by 21.1 % ( $p < 0.05$ ) and 27.5 % ( $p < 0.05$ ) fewer cows who developed diseases of reproductive organs and digestive tract in the *pp* period than the control groups.

It was previously established that laser light has a bactericidal effect (Žilaitis et al., 2006) yet we failed to confirm this assumption. In our study, stimulation of the uterus and ovaries with LIL stimulation *in vivo* had no significant therapeutic effect. The period of recovery of cows with metritis stimulated with LIL was only by 0.6 days shorter than that of intact cows. Yet our study proved a synergic effect of stimulation with LIL and antibiotic therapy: the recovery period of cows treated with antibiotic and stimulated with LIL was by 1.7 days (13.8 %,  $p < 0.05$ ) shorter than that of cows treated with antibiotics alone.

It was observed that the service period of cows prophylactically stimulated with LIL or treated in combination with LIL stimulation and antibiotics was considerably shorter than that of cows who received no treatment or were treated with antibiotics alone. The most obvious positive effect of stimulation with LIL was established by comparison of the length

of calving–conception period in experimental and control cows. This index is an objective indicator of the reproduction status of cows (Kuhn et al., 2004) and can be regarded as one of the main indices revealing the reproduction performance in cows.

The obtained results showed that the calving–conception period in cows treated with antibiotics and stimulated with LIL was by 31.4 days (34.17 %, ( $p<0.05$ ) shorter than that of cows who received antibiotic treatment alone and by 31.6 days (34.39 %, ( $p<0.05$ ) shorter than that of cows who received no prophylactic treatment.

Stimulation with LIL statistically significantly shortened the period between the calving and the first insemination. In cows treated with antibiotics and stimulated with LIL it was by 17 days (36.9 % ( $p<0.05$ ) shorter than in cows who received antibiotic treatment alone.

Based on the obtained results, we may conclude that prophylactic stimulation of cows with LIL in the early *pp* period had a positive effect on the regeneration of the ovary function and oocyte maturation and has economic worth. Stimulation with LIL can be used as an effective physiotherapeutic method for optimization of the treatment of *pp* complications.

It was observed that the calving-conception period in most of the cows stimulated with LIL and treated with antibiotics ranged between 8 and 100 days. In this group, service period of not a single cow exceeded 160 days. Meanwhile, the service period of some cows not stimulated with LIL even reached 300 days. This is a good proof of the universality of LIL stimulation. This physiotherapeutic method is applicable in prophylactic treatment of cows with metritis irrespective of their age and productivity status.

In general, the obtained results confirm that superovulation is the more effective the greater is the number of germinal cells and follicles of different stages of development before superovulation.

Our data show that there is a strong correlation between the size of ovaries (left ovary  $r=0.843$ ,  $p<0.05$ , right ovary  $r=0.916$ ,  $p<0.05$ ) before and after superovulation. Thus, we may assume that the number of follicles, predetermining the size of ovaries before superovulation, can be regarded as one of the indicators of superovulation efficiency.

Determining the number of small follicles with the aid of ultrasound test is not an easy task. Measuring the size of ovaries is a by far simpler task bearing in mind that the number of antral follicles in an individual is a constant. The knowledge of the correlation between the size of cow ovary and its response to superovulation allows regarding the size of ovaries as a presumptive indicator of donor compatibility. Our investigation showed that

the size of ovary before superovulation not only affects the size of ovary after superovulation but also the number of ovarian functional formations. The obtained moderate statistical correlation between the size of ovaries and the number of CL demonstrates the relationship between these indices.

On the day of embryo retrieval, CL is identified in the area of ovulated follicles. According to our data, the number of CL after superovulation will be greater in the bigger ovary before superovulation. This is in line with the observations that the response to ovary stimulation with gonadotropins, i.e. the efficiency of superovulation, depends on the number of antral follicles (thus on the size of ovaries) (Cushman et al., 1999).

We determined that cows with the smallest ovaries before superovulation most intensively responded to superovulation. Their ovaries after superovulation enlarged 4–5-fold. Yet in terms of the absolute size, the biggest before superovulation ovaries of cows in group III enlarged most. Analysis of obtained data showed that ovaries of cows not stimulated with LIL enlarged on the average by 3.2 times ( $p<0.05$ ). It should be pointed out that after superovulation the ovaries of cows stimulated by LIL enlarged by 2.9 times ( $p<0.05$ ), i.e. the enlargement was by 16.5 % ( $p<0.05$ ) smaller than in not stimulated cows. We assume that after superovulation the smaller ovaries of stimulated cows are indicative of synchronization of oocyte maturation and ovulation by stimulation with LIL. In the group of cows stimulated with LIL, the number of follicles after superovulation was by 12. % ( $p<0.05$ ) lower and the number of CL was by 20.5 % ( $p<0.05$ ) higher than in the group of not stimulated cows.

According to our data, there is a moderate statistical correlation between the number of CL and the size of ovary before superovulation. As was pointed out above, the response to superovulation can be predicted according to the size of ovaries before superovulation. We may assume that there are more factors affecting ovarian response to stimulation with gonadotropins. Some authors have reported that no statistically reliable correlation between the number of follicles (and, according to our assumption, the size of ovaries) before superovulation and the yield of CL and embryos has been established (Fernandes et al., 2002).

Yet according to our data, the size of the left ( $r=0.810$ ,  $p<0.05$ ) and right ( $r=0.871$ ,  $p<0.05$ ) ovaries before superovulation statistically strongly correlates with the number of flushed embryos. Many authors have reported that the number of 3–6 mm follicles before superovulation correlate with the response to superovulation (Romero et al., 1991, Kawamata, 1994). The common opinion that the bigger ovaries before superovulation predetermine the greater yield of embryos suitable for transfer is supported by the results of our investigation.

We also established a strong and statistically reliable correlation between the size of left and right ovaries before superovulation (left ovary  $r=0.701$ ,  $p<0.05$ , left ovary  $r=0.712$ ,  $p<0.05$ ) and the number of embryos suitable for transfer. It was determined that the bigger is the ovary before superovulation the bigger will be the number of embryos suitable for transfer. During our experiment, the number of embryos flushed from the cows with the biggest ovaries before superovulation was by 3.7 times ( $p<0.05$ ) and the number of embryos suitable for transfer by 3.1 times ( $p<0.05$ ) greater than from cows with the smallest ovaries of group I. It was determined that the yield of embryos is considerably augmented by stimulation of ovaries with LIL during superovulation. In the group of cows stimulated with LIL the number of flushed embryos was on the average by 29 % ( $p<0.05$ ) higher and the number of embryos suitable for transfer was on the average by 15.9 % ( $p>0.05$ ) higher than in the groups of cows not stimulated with LIL.

According to our findings, the ovarian response to superovulation depends on the topographic position of ovaries. Many reporters have pointed out the functional asymmetry of reproductive organs. Based on our data, the right ovary is bigger and its response to superovulation was stronger than that of the left ovary. The asymmetry of ovaries established before superovulation (right ovaries are on the average by 24.7 % ( $p<0.05$ ) bigger) persisted after superovulation. The right ovaries were on the average by 21.4 % ( $p<0.05$ ) bigger in cows stimulated with LIL and by 27.3 % ( $p<0.05$ ) bigger in the groups of not stimulated cows.

The obtained results are in agreement with the data of other authors who state that the right ovaries usually are not only bigger in size but also more active (Pierson, Ginther, 1987). According to our data, the right ovaries had on the average by 26.29 % ( $p<0.05$ ) more follicles and on the average by 44.5 % ( $p<0.05$ ) more CL.

It is a common case in embryo transfer that after superovulation the quality and development stage of flushed embryos vary. According to development stages, the viable embryos usually differ by 24–48 hours. Yet their compatibility strongly depends on their quality (Lindner, Wright, 1983). The quality of oocyte depends on the mode, time and dose of hormonal stimulation and on superovulation scheme (Sirard et al., 2006). The quality of oocytes is of paramount importance for for transfer. Researchers are trying to find the new ways to improve the oocyte quality. Various stimulation methods, alternative to gonadotropins, are tested (McNatty et al., 2014).

Our research proved a positive effect of stimulation with LIL on the development and quality of embryos. It was established that ovary stimulation with LIL synchronizes ovulation because only a negligibly

smaller number of unfertilized oocytes were flushed from stimulated cows. The number of early blastocysts was by 4.89 % ( $p<0.05$ ) and blastocysts by 3.82 % ( $p>0.05$ ) greater than in unstimulated cows. Moreover, the yield of excellent (I grade) embryos was by 4.12 % ( $p<0.05$ ) higher and the number of dead or degenerated embryos by 2.02 % ( $p>0.05$ ) smaller in the cows stimulated with LIL than in the unstimulated cows.

As during our experiment the last stimulation with LIL was conducted 1 hour after insemination the higher statistically significant yield of embryos from cows stimulated with LIL might have been influenced by successful fertilization of oocytes. This assumption is based on many previous investigations reporting a positive effect of stimulation with LIL on spermatozoa motility and better fertilization ability. It was determined that laser stimulation intensifies adenosine triphosphate production in the mitochondria and concurrently increases the amount of energy in cells. As the spermatozoa motility and oocyte maturation depend on the energy contained in a cell it is no surprise that the greater amount of energy induced by exposure to laser light facilitate these processes (Abdel-Salam, Harith, 2015).

## Conclusions

**1. Prophylactic stimulation of cows using LIL stimulation in the early *pp* period had a positive effect on fast regeneration of ovary function and complete maturity of oocytes. The positive effect of LIL stimulation was established for the following reproduction indices of cows:**

1.1. The time of the first insemination (period between calving and the first insemination) in the group of cows *pp* prophylactically treated with antibiotics and subjected to LIL stimulation was on the average by 17 days (36.9 %,  $p<0.05$ ) shorter than in the group of cows treated with antibiotics alone and on the average by 16 days (34.7 %,  $p<0.05$ ) shorter than in the group of cows not subjected to prophylactic treatment;

1.2. The calving–conception period (time between calving and conception) in cows treated with antibiotics and stimulated using LIL was by 31.4 days (34.17 %,  $p<0.05$ ) shorter than than in the group of cows treated with antibiotics alone and on the average 31.6 days (34.39 %,  $p<0.05$ ) shorter than in the group of cows not subjected to prophylactic treatment;

1.3. Cows with metritis subjected to prophylactic treatment with antibiotics and stimulation with LIL recovered by 1.7 days (13.8 %) faster ( $p<0.05$ ) than cows treated with antibiotics alone. As a result of prophylactic

LIL stimulation, the number of cows with *pp* disorders of reproductive organs and alimentary tract was smaller by 21.1 % ( $p<0.05$ ) and after combined treatment with antibiotics and stimulation using LIL by 27.5 % ( $p<0.05$ ) than the number of cows with these disorders who were not subjected to prophylactic treatment.

**2. Stimulation of ovaries using LIL during superovulation affected the size of ovaries after superovulation, the number of CL and follicles and the yield of embryos:**

2.1. After superovulation, the enlargement of the size of ovaries in cows stimulated with LIL was on the average by 16.5 % ( $p<0.001$ ) smaller than in unstimulated cows (in stimulated cows the ovaries enlarged by 2.9 times ( $p<0.001$ ) on the average and in unstimulated cows by 3.2 times ( $p<0.001$  on the average);

2.2. Judging by the number of follicles and CL, exposure to LIL stimulation during superovulation strengthens the efficiency of superovulation. The ovaries of stimulated cows contained on the average by 12.1 % ( $p>0.05$ ) fewer follicles and by 20.5 % ( $p<0.05$ ) more CL than the ovaries of unstimulated cows;

2.3. The number of flushed embryos during superovulation from cows stimulated with LIL was on the average by 29 % ( $p<0.05$ ) and the number of embryos suitable for transfer by 15.9 % ( $p>0.05$ ) higher than in the group of unstimulated cows.

**3. Correlation was determined between the size of ovaries and their topographic position before and after superovulation:**

3.1. According to the size of ovaries before superovulation, it is possible to predict their size after superovulation. A strong correlation was established between the size of ovaries (left ovary  $r=0.843$ , ( $p<0.05$ ), right ovary  $r=0.916$ , ( $p<0.05$ )) before and after superovulation. During superovulation, the ovaries of control cows enlarged on the average by 3.2 times ( $p<0.001$ ). The enlargement of the biggest right ovaries before superovulation (group III) exceeded the enlargement of the medium size (group II) left ovaries on the average by 91.8 % ( $p<0.001$ ).

3.2. The asymmetry of ovaries before superovulation (right ovaries by 24.7 % ( $p<0.05$ ) bigger) persisted after superovulation. The right ovaries were on the average by 21.4 % ( $p<0.001$ ) bigger in cows stimulated with LIL and by 27.3% ( $p<0.01$ ) bigger in unstimulated cows;

3.3. Based on the number of functional formations, it was determined that the response of right ovaries to superovulation was more effective. The right ovaries of unstimulated cows after superovulation contained on the average by 26.29 % ( $p<0.05$ ) more follicles and by 44.5 % ( $p<0.01$ ) more CL;

3.4. Judging by the number of CL, the weakest response to superovulation was characteristic of cows with the smallest (group I) ovaries before superovulation. The strongest response was characteristic of cows (group III) with biggest ovaries before superovulation. The number of CL in the ovaries of cows from group II was on the average by 88.5 % ( $p<0.001$ ) higher than in cows from group I. After superovulation, the right ovaries of cows from group III contained respectively by 110.8% ( $p<0.05$ ) and 40.5 % ( $p<0.05$ ) more CL than the right ovaries of cows from groups I and II;

3.5. A strong correlation between the size of ovaries before superovulation and the numbers of flushed (left ovary  $r=0.810$ , ( $p<0.05$ ), right ovary  $r=0.871$ , ( $p<0.05$ )) and suitable for transfer (left ovary  $r=0.701$ , ( $p<0.05$ ), right ovary  $r=0.712$ , ( $p<0.05$ )) embryos was established. The number of embryos flushed from cows of group III was respectively by 1.9 ( $p<0.001$ ) and 3.7 times ( $p<0.01$ ) higher than from groups II and I. The number of embryos suitable for transfer in group III was on the average by 1.6 ( $p<0.05$ ) and 3.1 ( $p<0.001$ ) times higher than in groups II and I respectively.

#### **4. It was determined that stimulation using LIL had a positive effect on the development and quality of embryos:**

4.1. Ovary stimulation with LIL more efficiently synchronizes ovulation. Fewer (2.02 %,  $p>0.05$ ) unfertilized oocytes and more early blastocysts (4.89 %,  $p<0.05$ ) and blastocysts (3.82 %,  $p>0.05$ ) were flushed from cows stimulated with LIL than from unstimulated cows;

4.2. By 4.12 % ( $p<0.05$ ) more excellent (I grade) and by 2.02 % ( $p>0.05$ ) fewer dead or degenerated embryos (grade IV) were flushed from LIL stimulated cows than from unstimulated cows.

### **Recommendations**

1. Based on the obtained results, we recommend using stimulation with low-level laser therapy as an extra ecological and efficient measure for treatment and prevention of reproductive impairments.

2. In order to avoid unpredictability of superovulation, we recommend measuring ovaries on the 75<sup>th</sup>–90<sup>th</sup> day *pp* in the 2<sup>nd</sup>–4<sup>th</sup> lactation Lithuanian black and white Holstein cows with milk yield during the last lactation 9500–10500 kg. Superovulation is feasible in donors whose ovaries contain no follicles bigger than 10 mm, CL is bigger than 10 mm and right ovary is bigger than 1235 mm<sup>2</sup>.

3. In order to increase the number of embryos suitable for transfer and to improve their quality, during superovulation ovaries of cows should be

stimulated using LIL. The stimulation of ovaries should be started on the first day of superovulation protocol using laser with light wavelength 870–970 nm, radiation power 65.93 J/cm<sup>2</sup>, frequency from 20 to 2000 Hz, and impulse duration about 1 s. We recommend performing stimulation once a day for 3 min 10 days in succession. During the stimulation, the laser position should be slowly shifted to irradiate 40x50 (200 cm<sup>2</sup>) sacroiliac area 5 cm from the skin surface. The last stimulation should be performed during oestrus 1 hour after insemination.

### **Publications**

Žilaitis V., Rudejevičienė J., Juozaitienė V., Krištaponis V., **Palubinskas G.**, Malinowski E. The prevalence of clinical metritis and fertility indices in cows treated with low-intensity laser irradiation and antibiotics in the postpartum period. *Veterinarski Arhiv*. 2013. Vol. 83. P. 1–9.

**Palubinskas G.**, Žilaitis V., Juozaitienė V., Laučienė L., Juodzentis V., Gavelis A., Sederevičius A. Superovulatory response in relation to the size and side of ovary location in high yielding dairy cows on the first day of treatment protocol. *Veterinarski Arhiv*. 2016. Vol. 86. P. 65–76.

### **Other publications**

Antanaitis R., Žilaitis V., Juozaitienė V., **Palubinskas G.**, Kučinskas A., Sederevičius A., Beliavska-Aleksiejūnė D. Efficient diagnostics and treatment of bovine mastitis according to herd management parameters. *Veterinarija ir zootechnika*. 2015. Vol. 69. P. 3–10.

### **Presentations and conferences**

#### **International conferences:**

1. IDF World Dairy Summit "Closing the Nutritional Gap with Sustainable Dairy": Vilnius, Lithuania, September 20–24, 2015. **"The Possibility to use low intensity laser irradiation to the superovulatory treatment of dairy cows–donors"**

2. Vet Congress Lithuania 2016, Kaunas, Lithuania, March 18, 2016. **"The effect of low level laser irradiation for embryo yield"**.

**National conference:**

Treatment and Prevention of Reproductive Disorders of High Productivity Cows by Applying Innovative Technologies, Kaunas, Lithuania, 2014 11 05. **"Prognostication of the Effectiveness of Superovulation and Embryo Yield According to Ovary Size and Functional Formations of Ovaries of Cows Before Superovulation"**

### **Curriculum vitae**

Giedrius Palubinskas was born on June 6 1965 in Baisogala, Radviliškis District. In 1983, he finished School No 12 in Šiauliai. In the same year, he entered the Lithuanian Veterinary Academy. Graduated from the Academy in 1990 after service in the Soviet Army (1984–1986) qualified as a veterinary doctor. From 1990 to 2000 worked as a veterinary doctor of the Republican Epizootic Team in Kaunas. From 2000 to 2001, after the reorganization of this institution he occupied a position of veterinary doctor at the Kaunas Centre for Food and Veterinary Extensive Education. Since 2001, has been head of the Veterinary Extensive Education and Consultation Centre.

## **GYVENIMO APRAŠYMAS**

Giedrius Palubinskas gimė 1965 m. birželio 6 d. Radviliškio r. Baisogaloje. 1983 m. baigė Šiaulių 12 vidurinę mokyklą. Tais pačiais metais įstojo į Lietuvos veterinarijos akademiją, kurią po tarnybos sovietinėje armijoje (1984–1986) baigė 1990 metais ir įgijo veterinarijos gydytojo specialybę. Nuo 1990 iki 2000 metų dirbo Respublikiniame Kauno epizootiniame būryje veterinarijos gydytoju. Po įstaigos reorganizacijos nuo 2000 iki 2001 m. – veterinarijos gydytojas Kauno maisto ir veterinarijos tęstinio mokymo centre. Nuo 2001 metų iki dabar – LSMU Veterinarijos tęstinio mokymo ir konsultavimo centro vadovas.

## **PADĖKA**

Dėkoju darbo vadovui prof. A. Sederevičiui už pasitikėjimą, palaikymą, vertingus patarimus ir visapusišką pagalbą.

Nuoširdų ačiū tariau vienam iš embrionų transplantacijos pradininkų Lietuvoje prof. V. Žilaičiui už konsultacijas, naudingus patarimus rašant disertaciją ir mokslinius straipsnius, nuoširdų ir draugišką bendravimą.

Esu dėkingas visiems embrionų transplantacijos grupės nariams ir kolegai M. Daugėlai už techninę pagalbą, malonų bendradarbiavimą, naudingus patarimus.

Ypatingus padėkos žodžius už kantrybę, supratimą, visokeriopą pagalbą ir skatinimą siekti užsibrėžto tikslo tariau savo artimiesiems, ačiū.