Endoskopowa inseminacja klaczy przy wykorzystaniu nasienia ogierów o normalnej i obniżonej wartości.

N. Ismer, M.Koene, M. Przewoźny

Tierärztliche Klinik für Pferde, Essener Str. 39 a, 49456 Lüsche, Niemcy

Summary:

Endoscopically controlled insemination in the mare using normal and low quality spermatozoa. (N. Ismer; M. Koene; M. Przewoźny)

Hysteroscopic insemination in the mare is a proven mthod which is used already under experimental conditions. Morris et al. (2000) obtained pregnancy rates up to 75 % with insemination doses of only 1-10 x 10^6 progressive motile spermatozoa (PMS).

88 mares were inseminated on two different commercial breeding stations by the use of a coloscope which was led transcervikal into the lumen of the uterus. The inseminate (100, 150, 200 x 106 PMS; 5-20 ml) was deposited on the papilla of the salpinx with a special catheter which was guided through the working channel of the endoscope after distension of the uterus with CO2 gas. At the same time 383 mares were inseminated on the same breeding centres with conventional technique (500 x 106 PMS; 10-20 ml) and the obtained pregnancy rates were compared to the ones from hysteroscopic insemination.

The used semen from one stallion was good quality (average of 57.5 % PMS; stallion 1). The other stallion had an asthenozoospermia with an average of 14.9 % PMS (stallion 2).

It was shown that endoscopically controlled insemination is a practical technique which can be used under field conditions. The pregnancy rates obtained with endoscopically controlled insemination were comparable (stallion 1; 45.0% vs. 70.2%) or even higher (stallion 2; 55.2% vs. 9.0%) then the ones from conventional insemination.

Streszczenie:

Inseminacja klaczy kontrolowana za pomoca endoskopu jest metodą, która w warunkach eksperymentalnych pozwoliła na osiągniecie współczynnika żrebności do 75% przy zastosowaniu nasienia zawierającego jedynie 1-10 x 10^6 plemników o ruchu postępowym w dawce inseminacyjnej (Morris et al. 2000).

W tym celu używano powszechnego w handlu kolonoskopu, który przeprowadzano przez szyjkę macicy i kierowano w odpowiedni róg macicy. Następnie za pomocą specjalnego kateteru prowadzonego przez kanał roboczy endoskopu deponowano nasienie na ipsilateralną brodawkę macicy.

Na jednej z prywatnych stacji ogierów o statusie EU w Oldenburgu zabiegowi inseminacji w warunkach terenowych poddano 88 klaczy nasieniem dwóch rożnych ogierów. Zabiegu dokonano różnymi dawkami inseminacyjnymi (100, 150 u. 200 x 10^6 PMS - Progressiv Motile Spermien – plemników o ruchu postępowym) oraz różną objętością (5 – 20 ml). Uzyskane dane zostały porównane z wynikami konwencjonalnej inseminacji (n=383) w tym samym sezonie rozpłodowym gdzie stosowano nasienie w objetosci 10-20 ml zawierające min. 500 x 10^6 PMS.

Sperma ogiera nr 1 wykazywała normalne parametry andrologiczne (Ø 57,5 % PMS).

Nasienie ogiera nr 2 wykazywało w czasie wielokrotnych badań asthenospermię (Ø 14,9 % PMS).

Zostało dowiedzione, że wymieniona metoda jest prosta do zastosowania w praktyce terenowej. Uzyskane za pomoca endoskopowej inseminacji klaczy wskaźniki źrebności u ogiera o obniżonej wartości nasienia były wyższe, a u ogiera o normalnym nasieniu porównywalne, z wartościami dla konwencjonalnej inseminacji.

Wstęp:

Powszechnie używane w inseminacji klaczy dawki nasienia zawierają minimum 500 x 10^6 PMS (Progressiv Motile Spermien – plemników o ruchu postępowym) (Klug 1993). Dla stacji ogierów o statusie EU od 2002 roku jest wymagane minimum 600 x 10^6 PMS dla nasienia wysyłanego w obrocie wewnątrzunijnym (Sieme et al.2001) . Nasienie o wyżej wymienionej jakości pozwala w warunkach terenowych w zależności od menagenentu uzyskać wskaźniki źrebności w granicach od 70% do 90% (Pickett, Voss 1975; Householder et al. 1981). Występują jednakże okoliczności w których ogier nie jest w stanie oddać wystarczającej objetości nasienia o wymaganej jakości w celu inseminacji przewidzianch dla niego klaczy. Taka sytuacja ma miejsce gdy chodzi o wartościowe genetycznie i popularne reproduktory. Innym zagadnieniem jest obniżona plodność ogierów o rożnej etiologii. Obniżona płodność może mieć podłoże genetyczne, patologiczne jak i jatrogenne. Przykładem może być

niewaściwe użycie anabolików sterydowych (Amann 1993), zapalenia jąder lub najądrzy (Schneider 1999), atrofia, fibroza lub degeneracja jąder (Klug 1999).

Cel badań:

Celem badań było sprawdzenie w jakim stopniu technika opisana przez Morrisa i innych (2000) pozwala wykorzystać się w praktyce terenowej oraz jakie wskaźniki źrebności mogą zostać osiągnięte przy wykorzystaniu nasienia o obniżonej dawce inseminacyjnej.

Materiał i metody:

W skład grupy doświadczalnej wchodziły 88 klacze podzielone na grupy. Klacze były inseminowane nasieniem dwóch ogierów (nr 1, nr 2).

Wykorzystywane nasienie było zawsze pobierane w dniu inseminacji oraz było badane mikroskopowo i makroskopowo pod względem barwy, konsystencji, objętości, gestości jak i ruchliwości. Ostatecznie nasienie było wirowane i przygotowywane według wytycznych EU. Nasienie ogiera nr 2 dotkniete było asthenospermią (obniżona ruchliwość plemników), której średnia wartość dla plemników o ruchu postępowym w wykorzystanych 42 ejakulatach wynosiła 14,9%.

Metody:

Technika inseminacji (ryc. 1)

Klacze wybrane do inseminacji pod kontrolą endoskopu wstawiano do poskromu. Po zabandażowaniu ogona następowało gruntowne mycie zewnętrznych narządow płciowych. Do histeroskopowej inseminacji używano powszechnego w handlu kolonoskopu (GIF-XQ 10, Olympus, Hamburg, długość robocza 1600 mm, średnica zewnętrzna 9,4 mm, średnica kanału roboczego 2,8 mm), który był dezynfekowany przed każdym zabiegiem. Endoskop przeprowadzano wpierw przez szyjkę macicy. Następnie macicę wypełniano CO_2 przy pomocy insuflatora (AR-10-901, Dr. Fritz, Tuttlingen) podłączonego do przewoźnej butli. Ciśnienie zwiększano maksymalnie do 50 mmHg, do momentu uzyskania dobrego pola widzenia w całym trzonie macicy (ryc.2). Połączenie insuflatora z endoskopem było zapewnione za pomocą silikonowego przewodu zakończonego koncówką typu Luer. Jako źrodło swiatła służył generator swiatła zimnego (Typ B, Dr. Fritz, Tuttlingen). Ostatecznie endoskop wprowadzano pod kontrolą wzroku do ipsilateralnego rogu macicy tak daleko aż

brodawka jajowodu była dobrze uwidoczniona (ryc.3). W tym momencie odcinano dopływ CO_2 i przez kanał roboczy endoskopu wsuwnano sterylny, wcześniej wypełniony nasieniem teflonowy kateter (długość robocza 2200 mm, średnica 2 mm, Dr. Fritz, Tuttlingen) aż do osiągnięcia okolicy brodawki jajowodu. Następnie deponowano nasienie na brodawkę jajowodu lub w jej bezpośrednią okolicę (ryc.4). Niezwłocznie potem usuwano endoskop z macicy.

Wyniki:

Nasieniem ogiera nr 1 zainseminowano pod kontrolą endoskopu łacznie 20 klaczy. Zabieg wykonano dawką zawierającą 100 milionów PMS w objetości 5 ml. Spośród tych klaczy 9 (45%) zaźrebiło się (tab.1). Nasieniem tego samego ogiera inseminowano metodą konwencjonalną 305 klczy, gdzie dawka inseminacyjna zawierała 500 milionów PMS przy objętości 10-20 ml. źrebność potwierdzono u 214 (70,2%) klaczy (tab.2).

Nasieniem ogiera nr 2 zainseminowano techniką endoskopową 21 klaczy dawką zawierającą 100 milionów PMS, 23 klacze dawką 150 milionów PMS oraz 24 klacze dawką zawierającą 200 milionów PMS. U wszystkich klaczy używano objetości nasienia od 10 do 20 ml. W pierwszej wymienionej grupie potwierdzono źrebność u 13 (61,9%) klaczy, w drugiej grupie u 8 (34,8%) klaczy oraz w trzeciej grupie u 16 (66,7%) klaczy. średnio odpowiada to źrebności 55,2% (37/68) (tab.1). Dla nasienia tego samego ogiera w tym samym sezonie rozpłodowym przy inseminacji metodą konwencjonalną uzyskano u 78 klaczy inseminowanych dawką zawierającą 500 milionów PMS źrebność jedynie u 7 (9%) klaczy (tab.2).

Tab.1: Wyniki źrebności dla nasienia ogierów nr 1 i nr 2 przy inseminacji techniką endoskopową.

ogier (nr)	objętość dawki inseminacyjnej (ml)	PMS dawki inseminacyjnej (mln)	liczba klaczy (n)	liczba klaczy źrebnych (n)	źrebność (%)
1	**5**	**100**	**20**	**9**	**45,0**
2	10-20	100	21	13	61,9
2	10-20	150	23	8	34,8
2	10-20	200	24	16	66,7
2	**10-20**	**100-200**	**68**	**37**	**55,2**

Tab.2 : Wyniki źrebności dla nasienia ogierów nr 1 i nr 2 przy insemonacji techniką konwencjonalną.

ogier (nr)	objętość dawki inseminacyjnej (ml)	PMS dawki inseminacyjnej (mln)	liczba klaczy (n)	liczba klaczy źrebnych (n)	źrebność (%)
1	10-20	500	305	214	70,2
2	10-20	500	78	7	9,0

Technika endoskopowej inseminacji klaczy okazała się być możliwa do zastosowania w praktyce terenowej. Po uzyskaniu pewnej wprawy zabieg inseminacji trwał od 2 do 5 minut przy średniej 3 minuty.

Dyskusja :

Technika okołobrodawkowej inseminacji videoendoskopowej jest wiele obiecującą metodą, która tak dla klaczy jak i dla ogierów może mieć wiele pozytywnych aspektów.

Możliwość histeroskopowej oceny macicy i szyjki macicy ze względu na anomalie rozwojowe, cysty, zlepy wewnątrzmaciczne, sekrecję, zawartość jak i konsystencję, barwę błony śluzowej macicy znacznie poszerza możliwości diagnostyczne w praktyce ginekologicznej klaczy (Schoon et al. 1992).

Dla ogierów metoda inseminacji endoskopowej jako najbardziej pozytywny aspekt przedstawia ogromne możliwości oszczędzania nasienia. Należy tutaj jednakże jasno podkreślić, że omawiana metoda może ułatwiać niebezpieczeństwo wykorzystania w hodowli ogierów o obniżonej płodnosci o podłożu genetycznym. Ten problem powinien być jednakże wykluczony przez badania andrologiczne przeprowadzane w momencie przyznawania licencji hodowlanych umożliwiających użytkowanie rozpłodowe ogiera. Ogiery których nasienie nie spełnia minimalnych kryteriów określonych dla młodych osobników nie mają szans na wykorzystanie w rozpłodzie (Merkt i Klug 1989).

Wykorzystanie tej metody potwierdziło swoją dużą przydatność w praktyce terenowej u ogierów, które ze względu na swoją wielką wartość hodowlaną a nie ze względu na wadę genetyczną, nie są w stanie pokryć olbrzymiego zapotrzebowania na swoje nasienie.

Udowodniono, ze możliwe jest uzyskanie porównywalnych wartości wskaźników źrebności przy metodzie konwencjonalnej wykorzystującej nasienie płodnego ogiera jak i wykorzystując metodę endoskopową przy zredukowanej liczbie plemników o ruchu postępowym w dawce inseminacyjnej.

U ogiera z asthenospermią możliwe było uzyskanie wyraźnego wzrostu wskaźnika źerbności pomimo używania dawek inseminacyjnych o zredukowanej liczbie plemników o ruchu postępowym.

Wyniki przedstawionych przez nas badań pozwalają zauważyć, że wskaźniki źrebności przedstawione przez Morris et al. (2000) są w warunkach terenowych bardzo trudne do osiągnięcia.

Literatura

AMMANN, R. P. (1993):
Effects of Drugs or Toxins on Spermatogenesis
in: A. O. MC KINNON, J. L. VOSS (Hrsg.): Equine Reproduction, Verlag Lea & Felbiger, Pennsylvania, S. 831 – 839

HOUSEHOLDER, D. D., B. W. PICKETT, J. L. VOSS, T. T. OLAR (1981):
Effect of extender, number of spermatozoa and hCG on equine fertility.
J. Equine vet. Sci. 1, S. 9-13

KLUG, E.(1993):
Frischsamenübertragung beim Pferd, 4. Auflage, Verlag M + H Schaper, Hannover, S. 65

KLUG, E. (1999):
Morpho- funktionelle Fortpflanzungsstörungen beim Hengst
in: O. Dietz, B. Huskamp(Hrsg.): Handbuch Pferdepraxis, Verlag Enke, Stuttgart, S. 555 – 566

MERKT H von., KLUG E.
Gesundheitliche und geschlechtliche Mindestanforderungen an Zuchthengste
Deutsch. Tierärztl. Wschr. 1989;96(9);459-464

MORRIS, L. H. A., R. H. F. HUNTER, W. R. ALLEN (2000):
Hysteroscopic insemination of small numbers of spermatozoa at the uterotubal junction of preovulatory mares
J. Reprod. Fertil., (118), 95 - 100

PICKETT, B. W., J. L. VOSS (1975):
The effect of semen extenders and sperm number on mare fertility.
J. Reprod. Fertil., Suppl. 23, S. 95-98

SCHNEIDER, H. – J. (1999):
Krankheiten der männlichen Geschlechtsorgane, Sterilisation und Kastration des Hengstes, Hermaphroditismus in: O. Dietz, B. Huskamp(Hrsg.): Handbuch Pferdepraxis, Verlag Enke, Stuttgart, S. 533 – 542

SCHOON, H. – A., D. SCHOON, E. KLUG (1992):
Uterusbiopsien als Hilfsmittel für Diagnose und Prognose von Fertilitätsstörungen der Stute.
Pferdeheilk. 8, (6), 355 - 362

SIEME, H., E., TÖPFER – PETERSEN, H. BADER, R. PETZOLDT, H. MERKT (2001):
A. I. sperm of the stallion: evaluation criteria and minimal standards – a survey
Pferdeheilk. 17 (2) 145 – 154

Ryc.1. : Urządzenia niezbędne do wykonania zabiegu endoskopowej inseminacji klaczy.
Ryc.2.: Wypełniony CO_2 trzon macicy z widocznym bifurcatio uteri i rogami macicy.
Ryc.3.: Widok na brodawkę jajowodu (w prawym górnym rogu).
Ryc.4.: Aplikacja nasienia bezpośrednio na brodawkę jajowodu.

Adres autora :
lek.wet. Maciej Przewoźny
Essener Str. 39 a
49456 Bakum-Lüsche
+ 48 600 855 362