

Katedra Rozrodu z Kliniką Zwierząt Gospodarskich

Wydział Medycyny Weterynaryjnej

Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu

Lek. wet. Jacek Mrowiec

Dopełcherzykowa inseminacja bydła

Rozprawa doktorska

Promotor

Prof. dr hab. Jan Twardoń

Wrocław, 2018

I. Streszczenie

Wstęp:

Inseminacja dopęcherzykowa jest biotechniką rozrodu polegająca na depozycji nasienia bezpośrednio do pęcherzyka przedowulacyjnego, przy wykorzystaniu specjalistycznego sprzętu. Pierwsze doniesienia o skutecznym wykorzystaniu tej procedury pochodzą z 1991 roku (Lucena i wsp., 1991). W medycynie człowieka metoda ta została zaadoptowana do leczenia przypadków niepłodności na różnym tle (Zbella i wsp., 1992; Nuojua-Huttunen i wsp., 1995; Yellamerreddy i wsp., 2000; Tocci i wsp., 2011; Lucchini i wsp., 2012). W medycynie weterynaryjnej tą drogą próbowano inseminować klacze (Meinties i wsp., 2000; Eilts i wsp., 2002) oraz krowy (Lopez i wsp.; 2011). Wyniki badań Lopez i wsp. (2011) mają obiecujący charakter, jednak wykonane zostały w stadzie o bardzo słabych wskaźnikach płodności. Brak natomiast w dostępnej literaturze jakichkolwiek informacji na temat skuteczności inseminacji dopęcherzykowej w stadzie charakteryzującym się prawidłową płodnością, przy wykorzystaniu zarówno nasienia nieseksowanego jak i seksowanego.

Cel:

Analiza skuteczności inseminacji dopęcherzykowej u bydła w warunkach fizjologicznych nasieniem nieseksowanym i seksowanym.

Materiał i metody:

1. Część laboratoryjna

W części laboratoryjnej doświadczenia badano wpływ płynu pęcherzykowego na przeżywalność, parametry morfotyczne i kinetyczne plemników. W tym celu przyżyciowo pobrano płyn pęcherzykowy od 6 krów (5 rasy holsztyńsko-fryzyjskiej i 1 polskiej czerwono-białej) metodą aspiracji przezpochwowej pod kontrolą manualną. Następnie uzyskany materiał odwirowywano z prędkością 10 000 x g przez 12 minut w temperaturze 4°C. Powstały supernatant odzielano i mrożono do momentu wykorzystania. Podczas doświadczenia właściwego, dodawano wcześniej ewkilibrowane w temperaturze 37°C w atmosferze zawierającej 5% CO₂ płyny: pęcherzykowy i fizjologiczny w stosunku 1:2 (płyn dodawano do nasienia). Mieszaniny inkubowano przez 8 godzin w temperaturze 37°C w atmosferze zawierającej 5% CO₂. W tym czasie w odstępach dwugodzinowych analizowano właściwości ruchowe plemników w badaniu mikroskopowym oraz w systemie CASA, badano odsetki gamet żywych i określano udział procentowy poszczególnych wad morfologicznych. Na początkowym i końcowym etapie procesu inkubacji badano ciągłość błon komórkowych oraz integralność błony akrosomalnej przy użyciu cytometru przepływowego i barwników fluorescencyjnych SYBR-14, PNA i PI.

2. Część kliniczna

W celu analizy skuteczności inseminacji dopęcherzykowej wśród zwierząt wytypowanych do badania (33 jałówki, 42 krowy) wydzielono dwie główne grupy zwierząt: jałówki, unasieniane nasieniem seksowanym i krowy, unasieniane nasieniem nieseksowanym. Każdą grupę podzielono na 3 podgrupy: inseminacja dopęcherzykowa (IFI), inseminacja domaciczna z dodatkiem płynu pęcherzykowego (IUIF) i standardowa inseminacja domaciczna (IUI). Zwierzęta inseminowano według wcześniej stworzonego algorytmu postępowania, bazującego na badaniu klinicznym, rektalnym oraz ultrasonograficznym. Inseminację dopęcherzykową wykonywano z pomocą asystenta, przy użyciu zestawu własnego projektu, składającego się z metalowej prowadnicy o długości 42,7 cm i średnicy 10 mm oraz pistoletu inseminacyjnego uzbrojonego w igłę o długości 16 mm i średnicy 0,6 mm. W przypadku unasieniania nasieniem nieseksowanym deponowano $\frac{1}{4}$ dawki inseminacyjnej (0,06 ml), a w momencie wykorzystania nasienia seksowanego całą słomkę (0,25 ml). Podczas inseminacji w grupie IUIF nasienie po rozmrożeniu inkubowano z płynem pęcherzykowym w stosunku 1:1 w temperaturze 37°C przez 30 minut. Inseminację domaciczną wykonywano w rutynowy sposób.

Wyniki

1. Część laboratoryjna

Analiza mikroskopowa wykazała istotne spadki odsetka plemników ruchliwych podczas inkubacji w obu płynach. Stwierdzono istotną statystycznie różnicę pomiędzy ruchliwością gamet w 8. godzinie inkubacji na korzyść płynu pęcherzykowego. Udział procentowy plemników żywych obniżył się istotnie zarówno wśród plemników przechowywanych w płynie pęcherzykowym, jak i w płynie fizjologicznym. Podczas oceny morfologicznej różnice wykazano jedynie w zakresie odsetka komórek z uszkodzonym akrosomem. Istotnie wyższy odsetek takich gamet stwierdzono zarówno na początku, jak i końcu inkubacji w płynie pęcherzykowym w stosunku do grupy kontrolnej. Automatycznie przełożyło się to na różnice procentowego udziału komórek o morfologii prawidłowej. Wyniki uzyskane w trakcie porównania właściwości ruchowych plemników na początku i na końcu okresu inkubacji wykazały istotny spadek w zakresie parametrów charakteryzujących ruch gamet (MOT, PMOT, RAPID, STATIC), zarówno w płynie pęcherzykowym, jak i fizjologicznym. Podczas oceny właściwości ruchu plemników stwierdzono istotne obniżenie wszystkich badanych parametrów w nasieniu inkubowanym w płynie pęcherzykowym (VAP, VSL, VCL, ALH, BCF, STR, LIN). W przypadku płynu fizjologicznego podobną tendencję wykazano dla następujących właściwości: VAP, VSL, VCL, ALH, BCF. Porównując wyniki wszystkich wspomnianych wyżej parametrów uzyskanych podczas inkubacji w obu płynach, istotny spadek wykazano dla:

VCL ($p=0,026$), ALH ($p=0,038$) a wzrost dla LIN ($p<0,001$) na początku inkubacji. W obrębie pozostałych właściwości nie stwierdzono różnic, zarówno w 0. jak i 8. godzinie inkubacji. Wyniki badania ciągłości błon komórkowych przy użyciu cytometru przepływowego wykazały istotny statystycznie wzrost udziału procentowego plemników zamierających w 8. godzinie badania podczas inkubacji nasienia w płynie pęcherzykowym. Nie stwierdzono natomiast różnic w zakresie komórek martwych i żywych. Z kolei w nasieniu przetrzymywanym w płynie fizjologicznym zanotowano istotny spadek odsetka plemników żywych i wzrost martwych. Porównując średnie odsetki poszczególnych grup komórek na poszczególnych etapach badania w obu płynach między sobą, wykazano istotnie wyższy udział gamet zamierających w nasieniu inkubowanym w płynie pęcherzykowym w 8. godzinie doświadczenia. Analiza integralności błony akrosomalnej i przeżywalności plemników w cytometrze przepływowym umożliwiła uzyskanie 4 subpopulacji komórek: żywych nieuszkodzonych, żywych uszkodzonych, martwych nieuszkodzonych i martwych uszkodzonych. Porównanie odsetka poszczególnych populacji w nasieniu inkubowanym w płynie pęcherzykowym wykazało istotne różnice w obrębie plemników martwych uszkodzonych i nieuszkodzonych. Grupa komórek martwych z zaburzoną integralnością błony akrosomalnej wzrosła o prawie taką samą liczbę punktów procentowych, o jaką zmniejszyła się grupa gamet martwych nieuszkodzonych (8,25% vs 8,78%). W przypadku inkubacji nasienia w płynie fizjologicznym wykazano istotny statystycznie spadek odsetka komórek żywych nieuszkodzonych (spadek o 10,91%; $p=0,031$) na korzyść subpopulacji komórek martwych nieuszkodzonych (wzrost o 11,23%, brak istotności statystycznej). Porównując oddziaływanie obu płynów, wykazano istotną statystycznie różnicę w zakresie subpopulacji komórek martwych uszkodzonych już na początku badania. Suma gamet uszkodzonych nie różniła się pomiędzy oboma płynami na tym etapie inkubacji.

2. Część kliniczna

W grupie jałówek ($n=10$), jak i krów ($n=14$) inseminowanych dopęcherzykowo nie uzyskano ani jednej ciąży, potwierdzonej badaniem klinicznym. Płodność w grupach kontrolnych była na zadowalającym poziomie, gdyż wskaźnik zapłodnialności w grupie jałówek unasienianych nasieniem seksowanym wyniósł 66.7%, a krów inseminowanych nasieniem konwencjonalnym 45%. W drugiej grupie badanej (inseminacja domaciczna nasieniem zmieszonym z płynem pęcherzykowym w stosunku 1:1) uzyskano ciążę zarówno wśród jałówek (2/8; 25%), jak i krów (1/8; 12.5%).

Wnioski

Analiza uzyskanych danych w konfrontacji z dostępną literaturą pozwoliła na postawienie następujących wniosków:

- Płyn pęcherzykowy, pochodzący od krów będących w rui, wpływa pozytywnie na przeżywalność plemników.
- Płyn pęcherzykowy, pochodzący od krów będących w rui, powoduje zaburzenia integralności błony akrosomalnej. Proces ten pojawia się bardzo szybko po zmieszaniu nasienia z płynem pęcherzykowym.
- Inseminacja dopęcherzykowa jest procedurą dalece bardziej skomplikowaną niż klasyczna inseminacja domaciczna oraz wymagającą dodatkowego sprzętu, asysty i umiejętności.
- Inseminacja dopęcherzykowa nie może stanowić alternatywy dla klasycznej inseminacji domacicznej.

Słowa kluczowe: inseminacja, dopęcherzykowa, bydło

II. Abstract

Introduction:

Intrafollicular insemination is a reproductive biotechnology basing on deposition of the semen directly into the preovulatory follicle, using specialized equipment. The first reports on the effective use of this procedure comes from 1991 (Lucena et al., 1991). In human medicine, this method has been applied to treat infertility cases on various backgrounds (Zbella et al., 1992, Nuojua-Huttunen et al., 1995, Yellamerreddy et al., 2000; Tocci et al., 2011; Lucchini et al. 2012). In veterinary medicine only mares (Meinties et al., 2000; Eilts et al., 2002) and cows were inseminated this way (Lopez et al., 2011a). The results of the research conducted by et al. (2011a) have a promising character, however, it was made in a herd with very low fertility rates. There is no information in the available literature about efficacy of intrafollicular insemination in a herd characterized by normal fertility, using both non-sexed and sexed semen.

Aim:

The aim of this study was to analyze the efficacy of intrafollicular insemination with sexed and non-sexed semen in groups of heifers and cows intended for reproduction.

Material and methods:

1. Laboratory part

In the laboratory part of the experiment, the influence of follicular fluid on survival, morphology and kinetic parameters of spermatozoa was evaluated. For this purpose, follicular fluid was collected from 6 cows (5 Holstein-Friesian and 1 Polish Red-white) by transvaginal aspiration under manual control. The collected material was then centrifuged at 10,000 x g for 12 minutes at 4 ° C. The supernatant was separated and frozen until use. During the main experiment both fluids (follicular and physiological; previously stored at 37° C in a 5% CO₂ atmosphere for 30 minutes) were added at a ratio of 1:2 to the semen. The mixtures were incubated for 8 hours at 37° C in a 5% CO₂ atmosphere. At this time, at two-hour intervals, the sperm motility was analyzed in a microscope and in the CASA system, the percentage of living gametes was examined and the percentage of particular morphological defects was determined. In the initial and final stages of the incubation process, the integrity of plasma membranes and the integrity of the acrosomal membrane was investigated using a flow cytometer and fluorescent probes SYBR-14, PNA and PI.

2. Clinical part

In order to analyze the efficacy of intrafollicular insemination among animals selected for experiment (33 heifers, 42 cows) two main groups of animals were created: heifers,

inseminated with sexed semen and cows, inseminated with non-sexed semen. Each group was divided into 3 subgroups: intrafollicular insemination (IFI), intrauterine insemination with the addition of follicular fluid (IUIF) and standard intrauterine insemination (IUI). The animals were inseminated according to a previously created algorithm based on a clinical, rectal and ultrasound examination. Intrafollicular insemination was performed with the help of an assistant, using a set of authors' own design, consisting of a metal probe 42.7 cm long and 10 mm in diameter and an insemination pistol armed with a 16 mm long needle and a diameter of 23 G. In the case of insemination with non-sexed semen, $\frac{1}{4}$ of the insemination dose (0.06ml) was deposited and when the sexed semen was used, the whole straw was placed (0,25 ml). During insemination in the IUIF group, sperm after thawing was incubated with the follicular fluid in a 1: 1 ratio at 37 ° C for 30 minutes. Intrauterine insemination was performed in a routine way.

Results

1. Laboratory part

Microscopic analysis resulted in significant decreases in the percentage of motile spermatozoa during incubation in both fluids. There was a statistically significant difference between spermatozoa motility at the 8th hour of incubation in favor of follicular fluid. The percentage of live spermatozoa decreased significantly both among sperm present in the follicular fluid and in the physiological fluid. During the morphological evaluation, the differences were shown only in the percentage of cells with damaged acrosome. Significantly higher percentage of such gametes was found both at the beginning and the end of incubation in the follicular fluid in relation to the control group. This automatically translated into differences in the percentage of cells with normal morphology. The results obtained during the sperm motility assessment at the beginning and end of the incubation period showed a significant decrease in the parameters characterizing the movement of gametes (MOT, PMOT, RAPID, STATIC), both in the follicular and physiological fluid. During the evaluation of sperm movement properties, a significant reduction in all parameters examined in the semen incubated in the follicular fluid was found (VAP, VSL, VCL, ALH, BCF, STR, LIN). In the case of physiological fluid, a similar trend was demonstrated for the following properties: VAP, VSL, VCL, ALH, BCF. Comparing the results of all the above-mentioned parameters obtained during incubation in both fluids, a significant decrease was observed for: VCL ($p = 0.026$), ALH ($p = 0.038$) and increase for LIN ($p < 0.001$) at the beginning of the incubation. Within the other properties, no differences were found at both the 0 and 8 hour incubations. The results of the plasma membrane integrity assessment showed a statistically significant increase in the percentage of dying sperm at the 8th hour of the study during incubation of sperm in the

follicular fluid. However, no differences were found in the range of dead and viable cells. In semen incubated in the physiological fluid, a significant decrease in the percentage of viable sperm and growth of dead was noted. Comparing the average percentage of particular groups of cells at individual stages of the study in both fluids, a higher proportion of dying gametes in the semen incubated in the follicular fluid at the 8th hour of the experiment was shown. Analysis of the integrity of the acrosomal membrane and the survival of sperm in the flow cytometer allowed to obtain 4 subpopulations of cells: live with intact acrosome, live with damaged acrosome, dead with intact acrosome and dead with damaged acrosome. The comparison of the percentages of individual subpopulations in the semen incubated in the follicular fluid showed significant differences within the sperm of the damaged and undamaged dead sperm. The group of dead cells with the disturbed integrity of the acrosomal membrane increased by almost the same percentage points, by which the group of dead gametes decreased (8.25% vs. 8.78%). In the case of semen incubation in physiological fluid, a statistically significant decrease in the percentage of live non-injured cells was found (decrease by 10.91%, $p = 0.031$) in favor of subpopulation of undamaged dead cells (increase of 11.23%, no statistical significance). When comparing the effects of both fluids, a statistically significant difference was found in the subpopulation of dead cells already damaged at the beginning of the study. The sum of damaged gametes did not differ between the two fluids at this stage of incubation.

2. Clinical part

In the group of heifers ($n = 10$), as well as cows ($n = 14$) intrafollicularly inseminated, no pregnancy confirmed by clinical examination, was obtained. Fertility in control groups was at a satisfactory level, because the pregnancy rate in the group of heifers inseminated with sexed semen was 66.7%, and in cows group inseminated with conventional semen was 45%. In the second experimental group (intrauterine insemination mixed with follicular fluid in a 1: 1 ratio), pregnancies were obtained both between heifers (2/8, 25%) and cows (1/8, 12.5%).

Conclusions

The analysis of the obtained data in the confrontation with the available literature allowed for the following conclusions:

- Follicular fluid, from cows in heat, has a positive effect on sperm survival.
- Follicular fluid from cows in heat causes disturbances in the integrity of the acrosomal membrane. This process appears very quickly after mixing the semen with the follicular fluid.

- Intrafollicular insemination is a far more complicated procedure than the classic intrauterine insemination and requiring additional equipment, assistance and skills.
- Intrafollicular insemination cannot be an alternative to classical intrauterine insemination.

Key words: insemination, intrafollicular, cattle