

Biorąc pod uwagę uzyskane efekty badań można powiedzieć, że zastosowane preparaty (Oestrophan-Spofa i Germast-Medi-Pharm) zarówno w skojarzonym leczeniu miejscowym różnych postaci zapalenia błony śluzowej macicy krów, jak i w leczeniu braku rui na tle zaburzeń czynnościowych jajników, wykazały przydatność w praktyce. Dowodem tego jest stosunkowo wysoki odsetek zacieleń przy korzystnym wskaźniku ciąży.

#### Piśmiennictwo

1. Arbetter K.: Dt. tierärztl. Wschr 80, 565, 1973.
2. Bielański W.: Rozród zwierząt, PWRiL, 1977, s. 180.

3. Buchholz G. W., Busch W.: Mh. Vet.-Med. 32, 95, 1977.
4. Dżido T.: Medycyna Wet. 37, 530, 1981.
5. Jędras A.: Medycyna Wet. 47, 174, 1991.
6. Kotowski K., Biernacki W.: Życie Wet. 57, 64, 1982.
7. Kotowski K.: Życie Wet. 63, 2, 1988.
8. Kotowski K.: Nowości Wet. 23, 174, 1990.
9. Samborski Z., Rautuszkiewicz S., Bocianek K., Mazur O.: Medycyna Wet. 39, 600, 1983.
10. Sommer H.: Vet. med. Nachr. 1—2, 41, 1975.
11. Zembrak A.: Wybrane zagadnienia weterynaryjne, AR-T Olsztyn, 1984.

Adres autora: dr Karol Kotowski, ul. Kombatantów 10, 63-600 Kępno

MICHAŁ BOCHENEK, WIESŁAW KARETA

## Domaciczna inseminacja owiec obniżoną dawką nasienia mrożonego i świeżego

Zakład Fizjologii Rozrodu, Instytut Zootechniki, 32-083 Balice k. Krakowa

### Summary

#### Intrauterine insemination of ewes with a lowered dose of frozen and fresh semen

Intrauterine insemination was done in three flocks comprising 207 sheep. The efficacy was determined on the basis of lambing using a frozen and fresh semen. The assessment of ovaria of sheep females was done after 59—68 hours since the removal of uterine sponges (Intervet) and the administration 660 i.u. of PMSG. The semen was frozen according to Aamdal's method and was thawed at 60°C. The semen was administered in animals on condition that its mobility was 50 per cent and applied within 1,5 hour since thawing. The fresh semen was used within 3 hours since its collection by an artificial vagina. A milk diluent, a dose containing 20 or 100 × 10<sup>6</sup> spermatozoons in 0.4 ml and stirring small balls or ejaculates taken from 3 rams were the same for the both kinds of semen. The efficacy of hormonal stimulation was assessed in 154 sheep and it was 91 per cent. Fertility in ewes after insemination before and after ovulation was 63 and 45 per cent, respectively. On an average after intrauterine insemination 48.8 per cent of lambing was obtained: using a fresh or frozen semen the percentage of lambing was 37.8 and 54.9 respectively (P ≤ 0.05). No differences were observed depending on semen doses or flocks — Merino 44 per cent, Pogorze 47 per cent, Friesian 64 per cent.

Długotrwała konserwacja nasienia tryków w stanie zamrożonym, mimo niezaprzeczalnych zalet tej metody, nie znalazła do tej pory szerszego zastosowania w praktyce. Wiąże się to z uzyskiwaniem niezadowalających wyników płodności po inseminacji tym nasieniem. Inseminacja doszyjkowa nasieniem mrożonym zapewnia w najlepszym razie płodność na poziomie 50% w jednym cyklu (7), co jest wynikiem i tak o 15—20% niższym od uzyskiwanego po użyciu nasienia świeżego. Ominięcie natomiast szyjki macicznej i wprowadzenie nasienia bezpośrednio do macicy, jak wykazały już wcześniejsze badania (2, 8, 14), rokuje osiągnięcie płodności po nasieniu mrożonym zbliżonej do krycia naturalnego.

Pierwszym celem prowadzonych prac było potwierdzenie zwiększenia płodności po inseminacji domacicznej nasieniem mrożonym. Równocześnie próbowano wyjaśnić, czy o płodności po inseminacji domacicznej

decydować może sposób konserwacji nasienia, podobnie jak to ma miejsce w przypadku unasienniania doszyjkowego. Dla wyjaśnienia tej kwestii zastosowano nasienie mrożone i świeże. W inseminacji doszyjkowej przeważa zdecydowanie praktyka stosowania dużej liczby plemników, nawet 200—300 mln w dawce (7, 13). Wiąże się to z koniecznością zagęszczania nasienia i stosowania niskich rozcieńczeń, co w konsekwencji prowadzi do uzyskiwania małej liczby dawek z ejakulatu, a tym samym niskiej produkcji mrożonego nasienia. Zastosowanie laparoskopii i deponowanie nasienia bezpośrednio do rogów macicy pozwala na wielokrotne ograniczenie liczby wprowadzanych plemników (5, 10, 14). Kolejnym celem niniejszej pracy było rozpoznanie możliwości pięciokrotnego obniżenia liczby plemników w dawce inseminacyjnej bez uszczerbku dla uzyskiwanej płodności.

### Materiał i metody

Zwierzęta doświadczalne i synchronizacja rui. Badania przeprowadzono w 3 stadach na 207 maciorach. Grupy liczyły: 100 maciorek rasy merynos polski, 68 maciorek owcy pogorza oraz 39 owiec fryzyskich. Ruję synchronizowano przy pomocy gąbek dopochwowych firmy Intervet zawierających 40 mg octanu fluorogestonu (FGA), przetrzymywanych przez okres 12—14 dni. W chwili wyjęcia gąbek podawano domięśniowo 660 j.m. PMSG (Biowet, Drwalew). Zabiegi wykonywano w okresie właściwego dla danej rasy sezonu rozrodczego.

Nasienie. Do inseminacji używano nasienia mrożonego i świeżego. Dla uniknięcia ryzyka użycia tryka lub ejakulatu o niezadowalającej płodności stosowano nasienie mieszane od trzech tryków zarówno w przypadku nasienia mrożonego, jak i świeżego.

Nasienie mrożone. Nasienie zamrażano wg zmodyfikowanej metody Aamdała, w kulkach, na powierzchni zestalonego CO<sub>2</sub> (7). Mrożenie dokonano w lutym i marcu 1990 r. Do inseminacji użyto 6 ejakulatów od trzech tryków rasy czarnogłówka. Zamrożone nasienie przetrzymywano w ciekłym azocie przez okres 1—7 miesięcy. Rozmrażania dokonywano w urządzeniu Piatova, zmodyfikowanym w I.Z., zapewniającym dużą szybkość tego procesu w temperaturze ok 60°C. Podczas rozmrażania łączono 3 kulki nasienia różnych ejakulatów od trzech różnych tryków. Następnie ustalano konieczną ilość rozcieńczalnika mlekowego (3) jaką należy dodać, aby uzyskać w objętości 0,4 ml lub 100 × 10<sup>6</sup> plemników. Dawkę inseminacyjną dzielono i po połowie wprowadzano do każdego rogu macicy. Podstawą kwalifikacji nasienia do inseminacji było stwierdzenie po rozmro-

zeniu co najmniej 50% plemników o ruchu postępowym. Jako termin przydatności do inseminacji przyjęto okres 1,5 godziny od rozmrożenia. We wszystkich trzech stadach użyto nasienia tych samych tryków.

Nasienie świeże. W okresie przygotowawczym do stanówki wybierano trzy najlepsze pod względem jakości nasienia tryki. Ejakulatory pobierano do sztucznej pochwy codziennie przed inseminacją i po ich zmieszanu obliczano w komorze Bürkera koncentrację plemników. Stosowano rozcieńczalnik mlekowy (3) bez dodatku antybiotyków i glicerolu. Nasienie rozcieńczano w temperaturze 30–32°C w takim stosunku, by w jednej dawce inseminacyjnej o objętości 0,4 ml znajdowało się 20 lub 100 × 10<sup>6</sup> plemników. Dawkę dzielono na dwie części podobnie jak w przypadku nasienia mrożonego. Do inseminacji używano nasienia wykazującego po rozcieńczeniu minimum 60% plemników o ruchu postępowym. Rozcieńczone nasienie przetrzymywano w temperaturze pokojowej i wykorzystywano w ciągu 3 godzin od pobrania.

Inseminacja. Na 24 godziny przed inseminacją owce poddawano głodzeniu i wstrzymywano pojenie. Premedykację zwierząt przeprowadzano za pomocą domięśniowej iniekcji 0,6–1,0 ml Rometaru. Zwierzę unieruchamiano na specjalnym stole pod kątem 45° głową w dół. Zabiegi przeprowadzane między 59 a 69 godziną od wyjęcia gąbek i podania PMSG wykonywano przy pomocy laparoskopu firmy Storz zgodnie z metodą opisaną przez Killena i Caffery'ego (8). Po wystrzyżeniu i dezynfekcji okolic podbrzusza dokonywano dwóch wkłuć trokarami ok. 5 cm dogłowo od wymienia, 4–6 cm po obu stronach linii białej. W otwory wprowadzano wzornik i manipulator, a jamę brzucha wypełniano powietrzem przepuszczonym przez filtr ceramiczny. Jajniki kontrolowano na obecność pęcherzyków przedowulacyjnych lub ciałek żółtych. Nasienie wprowadzano w środkowym odcinku obu rogów macicy przy pomocy plastikowej strzykawki (wg projektu Zakładu Fizjologii Rozrodu) zakończonej igłą o długości 7 mm. Skuteczność inseminacji oceniano na podstawie wykotów

Układ doświadczalny. Zwierzęta podzielono na dwie grupy inseminowane nasieniem mrożonym lub świeżym. Zarówno w pierwszej, jak i w drugiej grupie wprowadzono podział na dwie podgrupy w zależności od liczby plemników w dawce. Połowa dawki nasienia wprowadzana do każdego z rogów macicy wynosiła 10 lub 50 × 10<sup>6</sup> plemników w 0,2 ml objętości, tak więc maciorki otrzymywały całkowitą ilość 20 lub 100 × 10<sup>6</sup> plemników. Jako zasadę przyjęto zmianę dawek i rodzaju nasienia po inseminacji każdego z trzech kolejnych owiec.

Oceny terminu owulacji dokonywano przyjmując jako podstawę stwierdzenie obecności na jajnikach pęcherzyków przedowulacyjnych lub ciałek żółtych. Tym sposobem zaliczano owce do grupy przed lub po wystąpieniu owulacji oraz tych, u których stymulacja hormonalna okazała się nieskuteczna.

## Wyniki i omówienie

Inseminację wykonano na 207 owcach, w tym 133 zwierzętom wprowadzono nasienie mrożone, a 74 świeże. Dawkę liczącą 20 i 100 mln plemników w nasieniu mrożonym podano odpowiednio 67 i 66 owcom, a w nasieniu świeżym odpowiednio 36 i 38 owcom.

Po nasieniu mrożonym wyniki w stadzie merynosy oceniane na podstawie wykotów wyniosły 54,9% i były zróżnicowane w zależności od dawki (tab. 1). Po inseminacji dawką 20 mln uzyskano 61,2% wykotów, zaś po dawce 100 mln — 48,5%. Różnica między dawkami okazała się nieistotna. Po inseminacji nasieniem świeżym uzyskano średnią płodność 37,8% (dla dawek 20 i 100 mln odpowiednio 30,1 i 44,7%), a różnica między dawkami była również nieistotna. Statystycznie istotna okazała się natomiast przewaga nasienia mrożonego zarówno dla dawki 20 mln plemników ( $p < 0,01$ ), jak i dla obu dawek razem ( $p < 0,05$ ).

Badaniu jajników poddano 154 maciorki (tab. 2). Stwierdzono, że stymulacja hormonalna była skuteczna u 140 owiec (90,9%), u 11 sztuk brak było rosnących pęcherzyków, zaś u 5 sztuk diagnoza budziła wątpliwości. Ze 140 reagujących na stymulację maciorek

Tab. 1. Wyniki inseminacji domacicznej

Nasienie	Dawka nasienia				Razem	
	20 × 10 <sup>6</sup>		100 × 10 <sup>6</sup>		insem. wykoc.	
	insem. (szt.)	wykoc. (%)	insem. (szt.)	wykoc. (%)	insem. (szt.)	wykoc. (%)
Mrożone	67	61,2 c	66	48,5	133	54,9 a
Świeże	36	30,1 d	38	44,7	74	37,8 b
Razem	103	50,5	104	47,1	207	48,8

Objaśnienia: a, b — istotność różnic  $p < 0,05$ , c, d — istotność różnic  $p < 0,01$ .

38 szt. (27,1%) znajdowało się na etapie przedowulacyjnym, a 102 (72,9%) były w trakcie lub już po owulacji. Najwcześniej w podanym przedziale czasu wystąpiła owulacja u owiec rasy merynos (87,5% stada), a w dalszej kolejności u owiec pogórza (71,6% stada) oraz owcy fryzyjskiej (30,8% stada). Płodność maciorek inseminowanych w okresie przedowulacyjnym wyniosła średnio 63,2% z wahaniami między rasami od 54,5% do 68,2%, zaś po inseminacji w okresie poowulacyjnym uzyskano średnio 45,1%, a wahania wyniosły od 38,1% do 58,3% (tab. 2).

Przeprowadzone badania wykazały dużą skuteczność metody laparoskopii zarówno w dziedzinie diagnostyki, jak i przy wykonywaniu zabiegów, co znalazło odzwierciedlenie przede wszystkim w możliwości łatwego deponowania nasienia bezpośrednio do macicy. Potwierdzono tym samym przydatność tej techniki w praktyce produkcji zwierzęcej, o czym zresztą informowały już wcześniej prace innych autorów (1, 4, 6, 11, 12).

Uzyskanie po inseminacji domacicznej średniej płodności na poziomie 48,8% jest rezultatem niezadowalającym i niższym od podawanych w literaturze (5, 9, 14). Odpowiada bowiem wynikowi osiąganym już wcześniej przez nas i to po doszyjkowej inseminacji nasieniem mrożonym (7). Z uwagi jednak na niespodziewanie niski wynik po inseminacji nasieniem świeżym (37,8%) została zaniżona średnia, która wobec tego nie odzwierciedla faktycznych możliwości tej metody. Rozpatrując bowiem dane wyłącznie po inseminacji nasieniem mrożonym uzyskuje się już płodność 55%, przekraczającą w niektórych grupach 60%, tj. zbliżoną do wyników krycia naturalnego. Średnia zaś płodność dla grup wahająca się od 26% do 75% była związana z rasą owiec oraz rodzajem użytego nasienia. Najwyższą średnią płodność dla stada — 64% osiągnięto u owiec fryzyjskich, a w dalszej kolejności u owiec pogórza — 47% i merynosów — 44%, co może być związane z terminem inseminacji i sezonowością procesów rozrodczych. Problem przypadkowego doboru zarówno tryków, jak i ejakulatów oraz związanego z tym ryzyka użycia nasienia słabszej jakości został w pracy rozwiązany mieszanym nasieniem użytego do inseminacji.

Pewnym zaskoczeniem była tendencja utrzymywania się wyższej płodności po inseminacji nasieniem mrożonym w stosunku do nasienia świeżego. W jednej z grup różnica ta okazała się nawet statystycznie istotna, chociaż podkreślić należy, że badania przeprowadzono na stosunkowo nielicznym materiale. Oczywiście, utrudnia to interpretację wyników. Szukając przyczyn tej tendencji można brać pod uwagę również słabszą jakość nasienia świeżego pobieranego od tryków w przyspieszonej o przeszło miesiąc wiosennej stanówce. Do tej pory nie natrafiono bowiem w dostępnej literaturze na informacje dotyczące wyższych efektów po inseminacji nasieniem mrożonym w stosunku do świeżego,

Tab. 2. Skuteczność inseminacji owiec w zależności od stanu fizjologicznego jajników kontrolowanych między 59 a 69 godziną po wyjęciu gąbek i podaniu PMSG\*

Rasa	Liczba badanych owiec	Stan jajników				Średnia płodność (%)
		przed owulacją		po owulacji		
		insem. liczba/%	wyloc. liczba/%	insem. liczba/%	wyloc. liczba/%	
Merynos	48	5/10,4	3/60,0	42/87,5	16/38,1	44,0
O. pog.	67	11/16,4	6/54,5	48/71,6	23/47,9	47,0
O. fryz.	39	22/56,4	15/68,2	12/30,8	7/58,3	64,0
<b>Razem</b>	<b>154</b>	<b>38/24,7</b>	<b>24/63,2</b>	<b>102/66,2</b>	<b>46/45,1</b>	<b>48,8</b>

Objaśnienie: \* — w tabeli nie uwzględniono owiec, u których stymulacja hormonalna okazała się nieskuteczna.

a tym bardziej nie spotkano się z tym w praktyce inseminacji doszyjkowej. Większość badaczy albo nie dokonuje porównania wyników po inseminacji nasieniem konserwowanym różnymi sposobami, albo donosi o zdecydowanie lepszych rezultatach po inseminacji domacicznej nasieniem świeżym (4, 5, 14).

Wydawać by się mogło, że przyjęte w przeprowadzonych badaniach ostrzejsze kryteria dotyczące nasienia świeżego, tj. minimum 60% ruchu prawidłowego wobec 50% dla nasienia mrożonego, stawiają je w uprzywilejowanej pozycji. Z przyjętych kryteriów oraz z faktu obliczania ogólnej liczby plemników (również martwych) wynika, iż w dawce nasienia świeżego ilość plemników żywych jest wyższa niż w przypadku nasienia mrożonego. Faktyczna liczba plemników wykazujących ruch prawidłowy jest więc w zależności od rodzaju użytego nasienia mniejsza od podawanej i wynosi dla nasienia mrożonego w zależności od stosowanej dawki — 10 i 50 mln, zaś dla nasienia świeżego — 12 i 60 mln. Tym bardziej wobec powyższego zaskakujące są uzyskane wyniki i w świetle dotychczasowego rozpoznania trudne do tłumaczenia. Można przypisywać je bardzo ostrej selekcji plemników, która następuje w procesach zamrażania — rozmrażania. Nie można również wykluczyć słabszej jakości nasienia świeżego pobieranego w okresie wiosennym. Jakkolwiek nie stwierdzono istotnych różnic w płodności po inseminacji różnymi dawkami, to jednak dał się zauważyć pewien spadek skuteczności nasienia świeżego wraz z obniżeniem dawki plemników. Potwierdziłoby to wcześniej wysunięte podejrzenie o słabszej wartości i przydatności do inseminacji tego nasienia w okresie wiosennym. Zależności tej nie obserwowano w przypadku nasienia mrożonego, gdzie wraz z obniżeniem dawki płodność nawet nieco wzrosła. Może to świadczyć korzystnie o przyjętej metodzie mrożenia nasienia i jego wartości zapładniającej.

Sądzić można, że najwyższa płodność obserwowana u owiec fryzyjskich może być związana z najkorzystniejszym dla nich terminem inseminacji w stosunku do owulacji (5, 9). Zjawisko to nie jest jeszcze dostatecznie jasno przedstawione w literaturze, stąd wymaga wyjaśnienia poprzez kontynuację obserwacji w tym zakresie. Badania te prowadzić winny do ustalenia optymalnego czasu inseminacji domacicznej w zależności od terminu owulacji. Będzie to stanowiło przyczynek do poprawy wyników inseminacji metodą laparoskopii, a zarazem wpłynie na zwiększenie wykorzystania mrożonego nasienia tryków.

#### Wnioski

1. Po inseminacji domacicznej nasieniem mrożonym możliwe jest uzyskiwanie płodności na poziomie krycia

naturalnego pod warunkiem dobrej synchronizacji z terminem owulacji.

2. Pięciokrotne zmniejszenie dawki plemników (ze 100 do 20 mln) nie powoduje obniżenia wyników płodności.

#### Piśmiennictwo

- Aitken R. P., Wallace J. M., Robinson J. J.: Anim. Prod. 50, 379, 1990.
- Andersen K., Aamdal J., Foujner J. A.: Zuchthyg. 8, 113, 1973.
- Curtis P. G., Forreath D. A., Polge C.: Proc. IV Int. Congr. Anim. Repr. Hague, 4, 952, 1961.
- Davis I. F., Kerton D. J., McPhee S. R., White M. B., Banfield J. C., Cahill L. P.: Reproduction in sheep, Camb. Univ. Press, 1984, s. 364.
- Findlater R. C. F., Haresign W., Curnock R. M., Beck N. F. G.: Anim. Prod. 53, 39, 1991.
- Haresign W., Reed S. R., Curnock R. M., Reed H. C. B.: Anim. Prod. 43, 553, 1983.
- Kareta W.: Fortpflanzungsbiologie und Fortpflanzungssteuerung bei Rind, Schwein und Schaf. Sammelband ausgewählter Beiträge über Ergebnisse der mehrseitigen wissenschaftlich-technischen Zusammenarbeit innerhalb des RGW im Zeitraum 1973 bis 1983. Forschungszentrum für Tierproduktion Dummerstorf-Rostock der Akademie der Landwirtschaftswissenschaften der D.D.R., 1990.
- Killen I. D., Caffery G. J.: Aust. Vet. J. 59, 85, 1982.
- Maxwell W. M. C.: Anim. Reprod. Sci. 10, 301, 1983.
- Maxwell W. M. C.: Anim. Reprod. Sci. 10, 309, 1986.
- Maxwell W. M. C., Butler L. G., Wilson H. R.: J. Agric. Sci. Camb. 102, 233, 1984.
- McKelvey W. A. C., Robinson J. J., Aitken R. P.: Theriogenology 24, 519, 1985.
- Salamon S., Evans G., Maxwell W. M. C.: 2 World Merino Conf., Comunicaciones, Reproduccion 2, 02, 1983.
- Walker S. K., Smith D. H., Little D. L., Warnes G. M., Quinn P., Seamark R. F.: Reproduction in Sheep, Camb. Univ. Press, 1984, s. 306.

Adres autora: mgr inż. Michał Bochenek, ul. Beskidzka 28/32, 30-622 Kraków

**FINNIE J. W., HAJDUK P.: Badanie immunohistochemiczne ekstrawazacji albumin plazmy w mózgu myszek po zastosowaniu toksyny epsilon Clostridium perfringens typ D. (An immunohistochemical study of plasma albumin extravasation in the brain of mice after the administration of Clostridium perfringens type epsilon toxin). Aust. Vet. J. 69, 261—262, 1992 (10).**

Clostridium perfringens typ D zasiedla jelita cienkie zdrowych przeżuwaczy. W pewnych okolicznościach może się jednak szybko namnażać i produkować duże ilości toksyny epsilon. Toksyna zwiększa przepuszczalność śluzówki jelit, przenika do organizmu i wywołuje ostrą, śmiertelną toksyję. Badania przeprowadzono na myszkach (12), którym podano dootrzewnowo letalną dawkę (0,5 ml) aktywowanej trypsyną prototoksyny epsilon i dekapitowano po 4 godzinach. Zastosowano perfuzyjną metodę utrwalania zmian stosując formalinę-aldehyd glutarowy. Badania wykazały ekstrawazację albuminy plazmy surowicy, głównie do przestrzeni pozanaczyniowych istoty białej mózgu. Immunoreaktywny materiał gromadził się w spoidle przednim, corpus callosum, okolicy komór bocznych i w corpus striatum, a także w corpus medullare mózdzku i w pniu mózgu. Uzyskane wyniki wskazują na zwiększenie przepuszczalności naczyń krwionośnych mózgu pod wpływem toksyny epsilon, czemu towarzyszy obrzęk istoty białej mózgu. Powstały obrzęk cofa się bardzo wolno.