

Zastosowanie metody elektroejakulacji do pobrania i oceny nasienia nieplodnego geparda

ANDRZEJ MAX, AGNIESZKA GRABIEC*, MACIEJ PIETRAK**, BEATA BAŁUCIŃSKA**

Katedra Nauk Klinicznych Wydziału Medycyny Weterynaryjnej SGGW, ul. Nowoursynowska 159c, 02-776 Warszawa

*Katedra Nauk Morfologicznych Wydziału Medycyny Weterynaryjnej SGGW, ul. Nowoursynowska 159, 02-776 Warszawa

**Miejski Ogród Zoologiczny, ul. Ratuszowa 1/3, 03-461 Warszawa

Max A., Grabiec A., Pietrak M., Bałucińska B.

Electroejaculation and semen characteristics in an infertile cheetah

Summary

The cheetah (*Acinonyx jubatus*) is one of highly endangered species because of low biodiversity, loss of habitat in the wild and reproductive problems in zoos, partially of male origin. The 11-year-old cheetah had no offspring in the past. Semen was collected by electroejaculation. The procedure was performed under general anesthesia using 3.5 mg of xylazine and 5.7 mg of ketamine per kg of body weight. An endorectal electrode was used and electrical stimuli were applied until ejaculation, which occurred as the result of 6 impulses. The 1 ml of semen collected was of olive colour, milky consistency and cat odour. The semen was evaluated microscopically as semi-dense. The progressive movement was observed in 15% of spermatozoa and 50% of spermatozoa were estimated as morphologically normal. The blood testosterone concentration amounted to <0,2 ng/ml. In conclusion, electroejaculation could be an effective method of semen collection in cheetah.

Keywords: cheetah, semen, electroejaculation

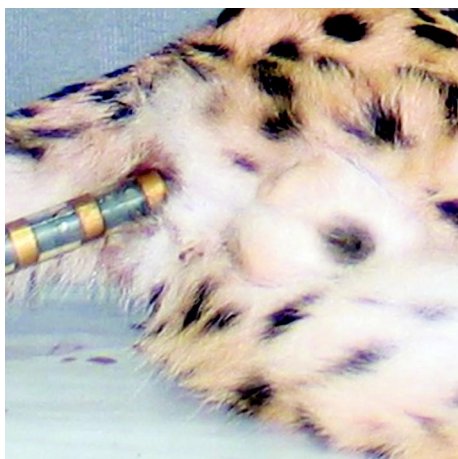
Gepard (*Acinonyx jubatus*) należący do rzędu drapieżnych (*Carnivora*), rodziny kotowatych (*Felidae*) jest gatunkiem umieszczonym w Czerwonej Księdze Gatunków Zagrożonych jako narażony (vulnerable) na wyginięcie. Wyróżnia się spośród innych przedstawicieli rodziny *Felidae* zarówno budową, jak i trybem życia. Jego wysmukłe kończyny, długi ogon, umiejętność szczekania oraz brak wciąganych pazurów stawiają ten gatunek na pograniczu kotowatych i psowatych. Zmniejszanie się terytorium, niekorzystne zmiany środowiskowe, niedostateczna zmienność genetyczna, choroby, ograniczona zdolność reprodukcyjna i straty bezpośrednie zadane przez inne drapieżniki lub przez człowieka powodują zagrożenie dla populacji gepardów wolno żyjących. W trosce o zachowanie gatunku podejmowane są różne inicjatywy, w tym także powstają odnośne organizacje, których przykładem jest Cheetah Conservation Fund (<http://www.cheetah.org>). Także ogrody zoologiczne biorą udział w międzynarodowych programach ochrony gatunków zagrożonych wyginięciem. Naturalny rozród gepardów w warunkach ograniczonej wolności napotyka jednak na trudności. Jedną z przyczyn może być nieplodność lub obniżona płodność samców, w tym także częściowo spowodowana przewlekłym stresem przejawiającym się podwyższonym stężeniem kortykosteroidów, z jednocześnie obniżonym stężeniem testosteronu (16). U kotowatych obserwuje się też znaczny odsetek plem-

ników zmienionych morfologicznie, u gepardów zaś może on sięgać nawet 97% (cyt. 5). Problem teratospermii (> 60% plemników wadliwych w ejakulacie) dotyczy wielu gatunków kotowatych, a jedną z najbardziej prawdopodobnych przyczyn jest mała różnorodność genetyczna. Spośród 23 badanych gatunków gepard znalazł się na trzecim miejscu pod względem odsetka plemników nieprawidłowych, których udział wynosił 86% (13).

Celem badań była ocena nasienia geparda, który wykazywał zaburzenia behawioralne w zakresie popędu płciowego. W przypadku gatunków zagrożonych często potrzebne są działania wspomagające rozród, powiązane z wyborem zwierząt najbardziej wartościowych. Badany osobnik odznaczał się dużą wartością hodowlaną, zajmując wysoką pozycję w rankingu inbredowym. Był włączony do programu hodowlanego, lecz nie udało się uzyskać jego potomstwa. Życzeniem hodowców było zatem zbadanie jego potencjalnej przydatności do rozrodu, przede wszystkim oceny jakości nasienia.

Materiał i metody

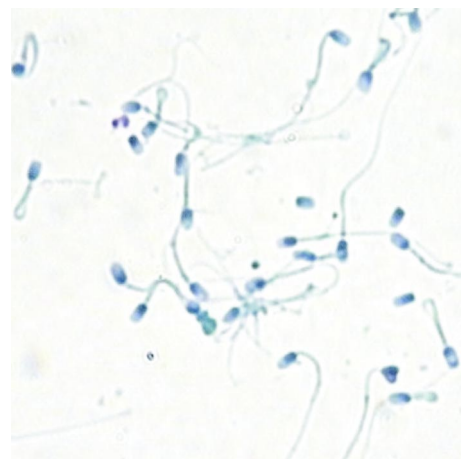
Badaniu poddano samca geparda o masie ciała 35 kg, w wieku 11 lat. Dotychczas przebywał on w kilku ogrodach zoologicznych i pomimo wielokrotnego łączenia go z samicami w rui nie dochodziło do skutecznego pokrycia. Często przejawiał agresję wobec samicy bez próby kopulacji. Przed przy-



Ryc. 1. Sonda z elektrodami okrężnymi wprowadzana do odbytnicy geparda



Ryc. 2. Prącie geparda po wysunięciu z napletka



Ryc. 3. Mikroskopowy obraz nasienia geparda

stąpieniem do znieczulenia geparda umieszczono w małym pomieszczeniu, w celu zabezpieczenia przed ewentualnym urazem po zadziałaniu leków. Zastosowano znieczulenie mieszaną hellabruńską (500 mg ksylazyny w substancji rozpuszczonej w 4 ml 10% ketaminy) w dawce 1 ml w połączeniu z 1 ml 10% ketaminy, co stanowiło 3,5 mg ksylazyny i 5,7 mg ketaminy na 1 kg masy ciała zwierzęcia. Mieszaninę znieczulającą podano domięśniowo za pomocą dmuchawki. Urządzenie to stosuje się obecnie, obok bronii Palmera, do poskramiiania lub znieczulania zwierząt agresywnych bądź dzikich, gdy podanie leków w inny sposób jest trudne lub ryzykowne.

Po zaśnięciu gepard został przewieziony do sali zabiegowej, gdzie dokonano oględzin narządów rozrodczych oraz pobrania nasienia. Podczas badania palpacyjnego nie stwierdzono żadnych cech niedorozwoju, zmian morfologicznych oraz objawów chorobowych w obrębie worka mosznowego, napletka i prącia.

Do elektrostymulacji zastosowano sondę z elektrodami okrężnymi, którą wprowadzono pod kontrolą palca do odbytnicy zwierzęcia leżącego w pozycji bocznej (ryc. 1) na głębokość zapewniającą kontakt wszystkich elektrod z błoną śluzową jelita. Wierzchołek prącia wyeksponowany z napletka (ryc. 2) wprowadzono do naczynka szklanego z ciepłym płaszczem wodnym. Procedurę elektroejakulacji przeprowadzono według schematu stosowanego u kotów domowych (10), stosując impulsy o płynnie zwiększającym się napięciu elektrycznym z jednoczesną obserwacją reakcji zwierzęcia. W badaniu mikroskopowym wykonanym wkrótce po pobraniu nasienia oceniano szacunkowo odsetek plemników o ruchu postępowym oraz gęstość nasienia, posługując się 4-stopniową skalą: gęste, średnio gęste, rzadkie, oligospermia. Następnie sporządzono rozmaz nasienia z barwieniem (Hemacolor) i badano w mikroskopie świetlnym pod imersją. Oceny morfologii plemników dokonano dwukrotnie, licząc plemniki prawidłowe i wadliwe. Za wynik przyjęto średnią arytmetyczną z obu przeprowadzonych obliczeń. Pobrano krew żylną w celu oznaczenia stężenia testosteronu metodą chemiluminescencji.

Wyniki i omówienie

Stężenie testosteronu we krwi badanego geparda wyniosło $< 0,2$ ng/ml. W oznaczeniach wykonanych u 12 innych gepardów w wieku 3-9 lat o masie ciała 31-56 kg wynosiło ono 0-11,68 nmol/l, średnio 5,63

nmol/l, co stanowi 1,62 ng/ml (3). Zatem u badanego samca stężenie testosteronu było niższe od cytowanej średniej wartości, co może częściowo tłumaczyć jego słaby popęd płciowy, w wyniku czego nie dochodziło do kopulacji. Jednorazowy pomiar stężenia testosteronu nie odzwierciedla jednak jednoznacznie zdolności wydzielniczej komórek Leydiga, ponieważ poziom tego hormonu może wykazywać zmienność zarówno dobową, jak również sezonową. Stężenie testosteronu badane w suchym kale gepardów w warunkach ogrodu zoologicznego wynosiło $9,09 \pm 2,84$ ng/g i było parokrotnie niższe od stwierdzonego u zwierząt żyjących na wolności, wynoszącego $34,52 \pm 12,1$ ng/g (16), co może też częściowo tłumaczyć otrzymany niski wynik dotyczący zwierzęcia o ograniczonej swobodzie.

Podczas zabiegu elektroejakulacji, w momencie działania impulsów elektrycznych obserwowano u badanego geparda silne skurcze mięśni grzbietu i kończyn tylnych oraz wokalizację, podobnie jak u kotów domowych (10). Po serii 6 impulsów uzyskano ejakulat w objętości ok. 1 ml, barwy oliwkowej, konsystencji mlecznej, o zapachu kocim. W ocenie mikroskopowej nasienie sklasyfikowano jako średnio gęste, a ruch postępowy wykazywało 15% plemników. W zabarwionym rozmazie nasienia (ryc. 3) oceniono 50% plemników jako prawidłowe, podczas gdy pozostałe 50% cechowały wady morfologiczne, w których największy udział miały pojedyncze pętłe witki i luźne główki, stanowiąc łącznie 92% stwierdzonych wad.

U kotów domowych do zabiegu elektroejakulacji wykorzystuje się sondy o długości około 10 cm i średnicy około 1 cm, wyposażone w elektrody okrężne o szerokości około 5 mm lub podłużne (1, 9, 10, 18). Stosowano impulsy elektryczne prądem o napięciu 2-10 V w kilku seriach, każda po kilkadziesiąt impulsów (1, 10, 19). U dużych kotowatych używano sondy o średnicy od 1,5 do 2 cm z podłużnie przebiegającymi elektrodami, stosując od 60 do 80 impulsów łącznie, w kilku seriach (1, 4). Objętość ejakulatu kota domowego waha się w zależności od metody pobrania od 30-90 μ l przy użyciu sztucznej pochwy (6) do

110-490 μ l przy metodzie elektroejakulacji. Ci sami autorzy podają, że żywotność plemników była na poziomie 70-95%, a ruchliwość 60-90% (6, 8). Od ocelota (masa ciała 14 kg), margaja i kota tygrysięgo (gatunki o masie ciała około 3 kg) pozyskano, odpowiednio, nasienie o objętości 1,4; 0,5 i 0,3 ml i ruchliwości plemników wynoszącej 81, 73 i 71% (11). Inni autorzy podają, że otrzymali 1,05 ml ejakulatu od pantery mglistej, przy czym ruchliwość plemników wynosiła 71,7% (14). Niski odsetek plemników ruchliwych w badanym nasieniu geparda mógł być spowodowany domieszką moczu, co sugeruje oliwkowe zabarwienie ejakulatu. Nasienie pobrane od tego samego osobnika ponownie po kilku miesiącach (nie poddane badaniu mikroskopowemu) miało barwę szaro-białą (dane niepublikowane).

W publikacjach opisujących morfologię plemników kotowatych podkreśla się liczne występowanie różnych wad (5, 10, 15). Jak podają Pukazhenti i wsp. (13), u większości z 37 gatunków kotowatych, włączając koty domowe, stwierdza się teratospermie. U gepardów stwierdzano średnio ponad 70% plemników z różnego rodzaju wadami (13, 17). W innych badaniach pobierano w celu kriokonserwacji nasienie od gepardów wolno żyjących z terenów Namibii w Afryce oraz żyjących w ogrodach zoologicznych w Ameryce Północnej. W ejakulatach zaobserwowano znaczny odsetek (ponad 78%) plemników nieprawidłowych, w tym najczęściej z wadami wstawki i akrosomu. Ponadto stwierdzono plemniki z główką olbrzymią, małą, podwójną lub potrójną, plemniki z kroplą protoplazmatyczną, pętle wtki i obecność spermatyd (4). W badaniach własnych potwierdzono występowanie dużego odsetka plemników wadliwych morfologicznie. Należy przy tym wziąć pod uwagę, że pierwszy (w tym przypadku jedyny) badany ejakulat mogą cechować gorsze parametry w porównaniu do ejakulatów następnych, co wykazano u kotów domowych (2, 12). Ponadto przypuszcza się, że procedura pozyskiwania nasienia metodą elektroejakulacji może przyczyniać się do powstawania wad, szczególnie wtki (1, 10). Można sądzić, że również u badanego nieplodnego geparda obraz plemników był przynajmniej częściowo związany z uszkodzeniami wtórnymi. Z kolei Pukazhenti w niepublikowanych obserwacjach (cyt. 13) podaje, że stopień występowania deformacji plemników jest niezależny od metody pobierania ejakulatu. U kotowatych stosowane są trzy sposoby pozyskiwania plemników, a mianowicie: przy użyciu sztucznej pochwy (artificial vagina – AV), metodą elektroejakulacji oraz przepłukiwania nasieniowodów lub przewodu najądrza bezpośrednio po kastracji. Trzeci sposób wiąże się z utratą gonad, co w przypadku osobników rzadkich gatunków nie może być brane pod uwagę jako metoda z wyboru. Zaletami metody AV jest brak wpływu bodźców fizycznych i chemicznych na zwierzę oraz niskie koszty. Wykorzystanie tej metody wymaga jednak wytrenowania samca i obecności „prowokatora”

lub samicy w rui. Przez to metoda AV nie może być stosowana u dzikich kotowatych, a także ze względu na konieczność ich farmakologicznego uspokojenia. Tak więc praktycznie jedynym sposobem pozostaje elektroejakulacja (3, 5, 7, 15).

Procedura elektroejakulacji u geparda okazała się skuteczną metodą pobrania nasienia w celu jego oceny oraz ewentualnego wykorzystania do sztucznego unasienniania.

Piśmiennictwo

1. Axner E., Holst B. S., Linde-Forsberg C.: Morphology of spermatozoa in the cauda epididymidis before and after electroejaculation and a comparison with ejaculated spermatozoa in the domestic cat. *Theriogenology* 1998, 50, 973-979.
2. Axner E., Ström B., Linde-Forsberg C.: Sperm morphology is better in the second ejaculate than in the first in domestic cats electroejaculated twice during the same period of anesthesia. *Theriogenology* 1997, 47, 929-934.
3. Bertschinger H. J., Jago M., Nöthling J. O., Human A.: Repeated use of the GnRH analogue deslorelin to down-regulate reproduction in male cheetahs (*Acinonyx jubatus*). *Theriogenology* 2006, 66, 1762-1767.
4. Crosier A. E., Pukazhenti B. S., Henghali J. N., Howard J., Dickman A. J., Marker L., Wildt D. E.: Cryopreservation of spermatozoa from wild-born Namibian cheetahs (*Acinonyx jubatus*) and influence of glycerol on cryosurvival. *Cryobiology* 2006, 52, 169-181.
5. Donoghue A. M., Howard J. G., Byers A. P., Goodrowe K. L., Bush M., Blumer E., Lukas J., Stover J., Snodgrass K., Wildt D. E.: Correlation of sperm viability with gamete interaction and fertilization in vitro in the cheetah (*Acinonyx jubatus*). *Biol. Reprod.* 1992, 46, 1047-1056.
6. Dooley M. P., Pineda M. H.: Effect of method of collection on seminal characteristics of the domestic cat. *Am. J. Vet. Res.* 1986, 47, 286-292.
7. Howard J. G., Roth T. L., Byers A. P., Swanson W. F., Wildt D. E.: Sensitivity to exogenous gonadotropins for ovulation induction and laparoscopic artificial insemination in the cheetah and clouded leopard. *Biol. Reprod.* 1997, 56, 1059-1068.
8. Johnstone I.: Electroejaculation in the domestic cat. *Aust. Vet. J.* 1984, 61, 155-158.
9. Levy J. K., Miller L. A., Crawford P. C., Ritchey J. W., Ross M. K., Fagerstone K. A.: GnRH immunocontraception of male cats. *Theriogenology* 2004, 62, 1116-1130.
10. Max A., Grabiec A., Garnarcz M., Romanowicz-Barcikowska K.: Pobieranie nasienia kotów metodą elektroejakulacji. *Medycyna Wet.* 2004, 60, 1307-1311.
11. Morais R. N., Mucciolo R. G., Gomes M. L. F., Lacerda O., Moraes W., Moreira N., Graham L. H., Swanson W. F., Brown J. L.: Seasonal analysis of semen characteristics, serum testosterone and fecal androgens in the ocelot (*Leopardus pardalis*), margay (*L. wiedli*) and tigrina (*L. tigrinus*). *Theriogenology* 2002, 57, 2027-2041.
12. Pineda M. H., Dooley M. P., Martin P. A.: Long-term study on the effects of electroejaculation on seminal characteristics of the domestic cat. *Am. J. Vet. Res.* 1984, 45, 1038-1041.
13. Pukazhenti B. S., Neubauer K., Jewgenow K., Howard J., Wildt D. E.: The impact and potential etiology of teratospermia in the domestic cat and its wild relatives. *Theriogenology* 2006, 66, 112-121.
14. Pukazhenti B., Spindler R., Wildt D., May Bush L., Howard J.: Osmotic properties of spermatozoa from felids producing different proportions of pleiomorphisms: influence of adding and removing cryoprotectant. *Cryobiology* 2002, 44, 288-300.
15. Roth T. L., Swanson W. F., Blumer E., Wildt D. E.: Enhancing zona penetration by spermatozoa from a teratospermic species, the cheetah (*Acinonyx jubatus*). *J. Exp. Zool.* 1995, 271, 323-330.
16. Terio K. A., Marker L., Munson L.: Evidence for chronic stress in captive but not free-ranging cheetahs (*Acinonyx jubatus*) based on adrenal morphology and function. *J. Wildl. Dis.* 2004, 40, 259-266.
17. Wildt D. E., Bush M., Howard J. G., O'Brien S. J., Meltzer D., Van Dyk A., Ebedes H., Brand D. J.: Unique seminal quality in the South African cheetah and a comparative evaluation in the domestic cat. *Biol. Reprod.* 1983, 29, 1019-1025.
18. Zambelli D., Cunto M.: Semen collection in cats: Techniques and analysis. *Theriogenology* 2006, 66, 159-165.
19. Zambelli D., Cunto M., Prati F., Merlo B.: Effects of ketamine or medetomidine administration on quality of electroejaculated sperm and on sperm flow in the domestic cat. *Theriogenology* 2007, 68, 796-803.