

# Współczesne poglądy na temat alternatywnych metod sztucznej inseminacji bydła mlecznego

JACEK MROWIEC, JAN TWARDOŃ, GRZEGORZ J. DEJNEKA, ROLAND KOZDROWSKI

Katedra Rozrodu z Kliniką Zwierząt Gospodarskich Wydziału Medycyny Weterynaryjnej UP,  
pl. Grunwaldzki 49, 50-366 Wrocław

Mrowiec J., Twardoń J., Dejneka G. J., Kozdrowski R.

## Alternative techniques of insemination in dairy cattle

### Summary

Progress in stock farming has incontestably been related to the development of reproduction biotechnology, especially the introduction of artificial insemination (AI). In the female genital tract there are natural barriers decreasing the number of spermatozoa after insemination. Moreover, many pathologies of the uterus and oviducts can negatively affect the sperm. A great deal of research has been devoted to determining the optimal site for semen deposition, but the findings have frequently been diverse. The aim of this paper was to describe advanced insemination techniques in dairy cattle, which may improve AI. The paper discusses intraperitoneal insemination (IPI) and intrafollicular insemination (IFI). IPI consists in semen deposition in the peritoneal cavity in two ways: by a transvaginal or transcuteaneous (in the right flank) injection. It has been successfully performed in many species: cows, sheep, goats, rabbits, guinea pigs, rhesus monkeys and humans. The result of this method is highly dependent on the number of spermatozoa, precise oestrus detection and the site of sperm deposition. IFI is performed by a direct introduction of semen into the preovulatory ovarian follicle. So far, only one study has been carried out on dairy cattle. The results were promising, but further research is needed. Presumably both techniques will be useful in the treatment of some cases of bovine infertility.

**Keywords:** intrafollicular insemination, intraperitoneal insemination, cow

Współczesna hodowla bydła mlecznego w znacznej mierze zawdzięcza swój rozwój postępowi biotechnologii rozrodu, włączając w to przede wszystkim techniki konserwacji nasienia, jego porcjowania, przechowywania oraz zabieg sztucznego unasienniania. Dzięki wspomnianym wyżej procedurom można z jednego ejakulatu uzyskać ponad tysiąc porcji nasienia, a co za tym idzie, obniżyć koszty produkcji, ilość utrzymywanych buhajów, ułatwić kontrolę nad pulą genową populacji oraz zmniejszyć ryzyko transmisji chorób zakaźnych. Ze względu na stosunkowo niską liczbę plemników w ejakulacie oraz małą objętość dawki inseminacyjnej nasienie musi zostać zdeponowane bezpośrednio do trzonu lub rogów macicy. Niejednokrotnie z powodu błędów ludzkich, czy to związanych z wykrywaniem rui, czy z nieprawidłowym wykonywaniem zabiegu unasienniania, krowa nie zostaje zapłodniona. Warto w tym miejscu zaznaczyć, że wg Sreenan i Diskin odsetek zapłodnień po zabiegu inseminacji wykonanym w prawidłowy sposób i w odpowiednim czasie waha się w granicach 90% (15). Przeprowadzone przez Petersa i wsp. (11) badania wykazały jednak, że tylko 39% z 586 sprawdzonych inseminacji wykonanych przez profesjonalnych insemina-

torów zostało zakończonych wprowadzeniem nasienia do trzonu macicy. Ma to istotne znaczenie, gdyż szyjka macicy stanowi podstawową barierę dla transportu plemników. Szacuje się, że około 20% krów inseminowanych jest w niewłaściwym terminie, co oznacza, że 1/5 wyprodukowanego nasienia zostaje wykorzystana bezcelowo. Dodając do tego straty zarodkowe (na tle różnych przyczyn) uzyskujemy niejednokrotnie wskaźnik zapładnialności (CR – Conception Rate) kształtujący się na poziomie poniżej 50%. Badania oraz zabiegi mające na celu poprawę płodności krów prowadzone są wielokierunkowo. Dotyczy to zarówno skuteczności wykrywania rui, hormonalnego sterowania rozrodem, terapii chorób narządu płciowego oraz wielu innych aspektów, których nie sposób w tym miejscu wymienić.

Jednym z badanych zagadnień jest technika wykonywania samego zabiegu inseminacji oraz jej skuteczność zależna często od umiejętności i wiedzy inseminatora. Podstawowa metoda inseminacji, polegająca na wprowadzeniu nasienia do narządu płciowego, została wielokrotnie przebadana pod kątem miejsca oraz głębokości wprowadzenia nasienia. Dowiedziono bowiem, iż w przypadku krycia jedynie nieznaczny od-

setek plemników dociera do miejsca, w którym dochodzi do zapłodnienia, w związku z istnieniem naturalnych barier, takich jak: szyjka macicy, połączenie bańki z cieśnią jajowodu czy produkowany przez gruczoły śluz, dlatego przyjęto, że efektywność zabiegu powinna poprawić głęboka domaciczna inseminacja. Część autorów (4, 6, 8, 10) badających to zagadnienie wykazała poprawę zapłodnialności przy zastosowaniu głębokiej inseminacji do rogu ipsilateralnego w porównaniu do inseminacji do trzonu macicy. Inni badacze nie stwierdzili istotnych różnic pomiędzy wymienionymi miejscami wprowadzenia nasienia (2, 3). W związku ze zróżnicowaniem otrzymanych wyników prowadzone są badania nad zastosowaniem alternatywnych technik sztucznego unasienniania bydła, stosowanych już wcześniej w medycynie człowieka i u innych gatunków zwierząt.

Celem niniejszego artykułu jest opis metod inseminacji bazujących bądź na zdeponowaniu nasienia bezpośrednio do pęcherzyka jajnikowego przed owulacją, bądź do jamy otrzewnowej.

### Inseminacja dootrzewnowa

Technika inseminacji dootrzewnowej znana jest już prawie od 60 lat. Po raz pierwszy skutecznego unasiennienia tą drogą dokonał Skjerven (cyt. 16) w 1955 r. u jałówki. Na przestrzeni lat metodą tą udało się uzyskać ciążę u bydła, owiec, kóz, królików (tab. 1), świń morskich, szynszyli, świń, naczelnych, w tym u człowieka (16). U bydła oraz u ludzi została ona nawet wykorzystana jako metoda leczenia niepłodności. Lopez (5) nie uzyskał statystycznie istotnych różnic pomiędzy skutecznością inseminacji domacicznej a dootrzewnowej u krów powtarzających objawy rujowe.

Idea inseminacji dootrzewnowej bazuje na założeniu, iż plemniki mogą osiągnąć miejsce zapłodnienia komórki jajowej również z jamy otrzewnowej (Lopez *reviev*). Dowiedziono bowiem, iż nawet w przypadku krycia czy inseminacji konwencjonalnej część plemników może przedostawać się do jamy otrzewnowej, a stamtąd z powrotem do jajowodów (z tej samej bądź przeciwnej strony, od której wniknęły). Udowodniono również, że jajowody są w stanie „wciągać” drobne cząstki z jamy otrzewnowej, takie jak: atrament indyjski, cząstki węgla czy nawet jaja pasożytów i transportować je dalej do macicy (5). Lopez i wsp. (17) po inseminacji dootrzewnowej odzyskali plemniki z szyjki macicznej w 12-24 godz. po zabiegu. Dotyczyło to jednak w głównej mierze plemników uszkodzonych i nieruchliwych. Obecność gamet

w pobieranych wymazach szyjkowych była również w znacznym stopniu zależna od koncentracji plemników w deponowanej dawce. Co ciekawe, Brussow i wsp. (1), stosując niskie dawki plemników w inseminacji domacicznej i dootrzewnowej u świń, nie byli w stanie potwierdzić migracji plemników przez jamę otrzewnową do jajowodów. Uzyskanie przez wielu autorów ciąży po inseminacji dootrzewnowej bezsprzecznie wskazuje na możliwość wykorzystania tej metody. W związku z odstępstwami w stosunku do tradycyjnej inseminacji dotyczącymi transportu plemników do jajowodu pojawiają się jednak pytania dotyczące wpływu środowiska jamy otrzewnowej na gamety, sposobu i miejsca depozycji nasienia, dawki inseminacyjnej oraz ewentualnych skutków ubocznych zabiegu.

Oddziaływanie płynu w jamie otrzewnowej na plemniki nie jest w pełni wyjaśnione (16). Solidatii i wsp. (14) stwierdzili, że w czasie fazy *oestrus* płyn z jamy otrzewnowej może swobodnie przepływać do wnętrza jajowodu, nie zaburzając procesu zapłodnienia. Jednak płyn ten zostaje wymieszany z wydzieliną gruczołów narządu płciowego i stanowi jedynie część składową środowiska jajowodu. Revelli i wsp. (12) uzyskali rozbieżne wyniki dot. wpływu płynu otrzewnowego u kobiet na plemniki w warunkach *in vitro*. Również pytanie o zjawisko kapacytacji plemników w przypadku inseminacji dootrzewnowej pozostaje bez odpowiedzi. Nie wiadomo bowiem, czy plemniki podlegają ostatecznemu dojrzewaniu po zetknięciu się ze nabłonkiem błony surowiczej macicy (17), czy dopiero po przejściu do jajowodu oraz co w takim wypadku co stanowi rezerwuuar plemników? Należy pamiętać jednak, że plemniki podczas procesu mrożenia/rozmra-

Tab. 1. Liczba uzyskanych ciąż po inseminacji dootrzewnowej u poszczególnych gatunków zwierząt w porównaniu z innymi metodami (cyt. 17)

Gatunek/autor	Liczba zwierząt	Metoda	Obróbka nasienia	Liczba plemników ( $\times 10^6$ )	Ciąże n (%)
Krowa	Skjerven (1955)	IPI	brak	nieznana	1 (100)
	McDonald i Sampson (1957)	IPI	brak	nieznana	1 (25)
	Lopez-Gatius (1995)	IPI	mrożenie	45	9 (14,6)
		IUI	mrożenie	45	13 (20,6)
Królik	Adams (1969)	IPI	zag/pł	185-450	12 (48)
	Mroueh i Mastroianni (1966)	IPI	zag	nieznana	8 (25,8)
Koza	Gonzalez (1972)	IPI	rozrzedzenie	2500	3 (30)
		IVI	rozrzedzenie	2500	4 (80)
Owca	Negobatikov i wsp. (1981)	IPI	rozrzedzenie	20	27 (54)
		IPI	rozrzedzenie	25	75 (71)
		IPI	rozrzedzenie	35	61 (76)
		IPI	rozrzedzenie	80	37 (83)
		ICI	brak	nieznana	84 (60)

Objaśnienia: IPI – inseminacja dootrzewnowa; IUI – inseminacja domaciczna; IVI – inseminacja dopochwowa; ICI – inseminacja doszyjkowa; zag – zagęszczenie; pł – płukanie

żania słomek inseminacyjnych podlegają procesowi kriokapacytacji.

Co z kolei z dawką inseminacyjną? Wyniki wszystkich przeprowadzonych dotychczas badań nad inseminacją dootrzewnową pozwoliły na stwierdzenie, że wraz ze zwiększaniem liczby zdeponowanych plemników rósł odsetek uzyskanych ciąż. Przykładowo, zwiększając dawkę z 20 do 80 milionów plemników Negobatikov i wsp. (9) uzyskali wzrost wskaźnika zapłodnialności u owiec o 29%. Z kolei Rowlands i wsp. (13) deponując 50 milionów plemników do jamy otrzewnowej świnek morskich, uzyskali 100% skuteczność (standardowa dawka inseminacyjna wynosi 30 milionów gamet). Niestety, w przypadku bydła nie można dokładnie określić idealnej dawki inseminacyjnej, gdyż brak danych dotyczących ilości wykorzystanych plemników w badaniach Skjervena i McDonalda (za 16) (unasiennienia dokonano nasieniem świeżym). Lopez (5) wykonał skuteczne inseminacje dootrzewnowe u krów nasieniem mrożonym, deponując 45 milionów plemników.

Zasadniczo istnieją dwie podstawowe drogi wykonania zabiegu: wkłucie przez sklepienie pochwy i wprowadzenie nasienia na trzon macicy oraz iniekcja przez powłoki brzuszne i zdeponowanie nasienia w okolicy jajników pod kontrolą ultrasonografu bądź laparoskopu. U bydła preferowana jest metoda pierwsza, gdyż jest łatwiejsza wykonaniu, do kontroli wystarczy jedynie badanie manualne przez prostnicę, a co najważniejsze, uzyskano przy jej użyciu lepsze rezultaty (17).

Technika wykonywania zabiegu jest stosunkowo prosta i nie wymaga skomplikowanego sprzętu. Lopez (5) wykorzystywał szklaną rurkę o długości 44 cm i 10 mm średnicy jako prowadnicę dla pistoletu inseminacyjnego, na osłonkę którego montował igłę o długości 4 cm i średnicy 19. Rurka po uprzedniej dezynfekcji wprowadzana była wraz z ręką do pochwy i opierana o sklepienie. Następnie wprowadzono pistolet uzbrojony w igłę, przekłuwano się przez ścianę pochwy i zdeponowano nasienie w okolicy trzonu macicy. Autorzy niniejszej publikacji sugerują, że szklaną rurkę można zastąpić prowadnicą z metalu lub z tworzywa sztucznego, zmniejszając ryzyko uszkodzenia dróg rodnych w przypadku zbitcia szkła.

Poza przygotowaniem aprowizacyjnym oraz wypracowaniem odpowiedniej techniki, niezmiernie ważny jest czas wykonywania zabiegu. Sugerowany, najlepszy okres to czas najbliższy owulacji, powinien on jednak być dopasowany do określonego gatunku zwierzęcia (16). U bydła najlepiej termin zabiegu wyznaczać badaniem rektalnym narządu płciowego.

Wprowadzenie obcego materiału do jamy otrzewnowej, jakim jest nasienie, może nieść ryzyko infekcji, szoku anafilaktycznego, tworzenia zrostów lub immunizacji przeciwko plemnikom, jednak tego typu zjawiska zaobserwowano tylko u ludzi, u myszy (którym podawano nasienie bez adjuwantów) oraz u kró-

lików (zwiększenie ilości płynu oraz zrosty), natomiast u innych gatunków nie były one notowane. W celu zmniejszenia prawdopodobieństwa wystąpienia efektów ubocznych proponowane jest płukanie oraz wirowanie nasienia.

Pomimo pewnych niewiadomych dotyczących inseminacji dootrzewnowej należy traktować ją jako realną alternatywę w stosunku do konwencjonalnego zabiegu, gdyż umożliwia ominięcie naturalnych barier mechanicznych w narządzie płciowym samicy oraz negatywnego wpływu na plemniki ewentualnych stanów patologicznych.

### Inseminacja dopęcherzykowa

Pierwszy zakończony sukcesem zabieg inseminacji dopęcherzykowej u bydła został opisany przez Lopez i Huntera (7) w 2011 r. Wcześniej procedura ta była wykonywana jedynie u ludzi i koni (cyt. 7).

Istota metody polega na wprowadzeniu nasienia bezpośrednio do pęcherzyka przedowulacyjnego. Podobnie jak w przypadku inseminacji dootrzewnowej wykonanie zabiegu nie jest zbyt skomplikowane (7), wymaga jednak od operatora dobrej umiejętności badania rektalnego, szczególnie w odniesieniu do oceny struktur jajnikowych. Potrzebny sprzęt jest praktycznie taki sam, jak do inseminacji dootrzewnowej, jedynie igła nakładana na pistolet inseminacyjny powinna mieć inne rozmiary (23G, 18 mm długości [7]). W celu wykrycia właściwego momentu inseminacji krowy Lopez i Hunter (7) proponują monitorowane narządu płciowego badaniem rektalnym palpacyjnym lub ultrasonograficznym. Samice powinno się unasienniać wówczas, gdy ciało żółte na jajniku ma mniej niż 10 mm bądź jest niewyczuwalne w badaniu palpacyjnym. Jednocześnie na jednym z jajników powinien zostać stwierdzony duży, miękki pęcherzyk, średnicy 12-25 mm. Bada się również reaktywność i konsystencję macicy oraz charakter śluzu, wydobywającego się ze szpary sromowej. W momencie inseminacji należy wprowadzić metalową prowadnicę o długości 44 cm i średnicy 10 mm do pochwy i oprzeć o jej sklepienie. Osoba wykonująca zabieg poprzez manipulację przez prostnicę ustala jajnik w taki sposób, aby ściana pochwy była jedyną barierą pomiędzy końcówką prowadnicy i pęcherzykiem. Następnie do rury wprowadza się uzbrojony w igłę pistolet inseminacyjny. Po wkłuciu do światła pęcherzyka deponuje się nasienie. Lopez i Hunter (7) wprowadzali 1/4 standardowej dawki inseminacyjnej, tj. 0,06 ml (5 milionów plemników, po rozmrożeniu 40% o ruchu prawidłowym). W trakcie wykonywania zabiegu cytowani autorzy nie stwierdzili żadnych uszkodzeń w obrębie pęcherzyków czy pochwy oraz dyskomfortu u inseminowanych zwierząt. Grupę kontrolną stanowiły krowy, które unasienniano głęboko do rogu macicy. W przypadku inseminacji dopęcherzykowej uzyskano 4 ciążę u 17 (23,5%) unasiennianych samic w stosunku do 3 spośród 33 inseminowanych konwencjonalnie (9%). W ciągu 11 dni

po inseminacji nie stwierdzono żadnych powikłań. Należy zaznaczyć, że doświadczenie dotyczyło jednak stada z poważnymi problemami rozrodczymi (wskaźnik zapłodnialności na poziomie 10% w ciepłych porach roku oraz 33% w chłodniejszych), a dodatkowo było wykonywane podczas gorących miesięcy. Selekcjonowane do badania samice były wolne od chorób narządu płciowego, chorób wymienia i kończyn oraz schorzeń metabolicznych.

Dotychczas nieznanne są mechanizmy oraz miejsce kapacytacji i zapłodnienia w przypadku inseminacji dopęcherzykowej. Lopez i Hunter (7) sugerują, iż dochodzi do tego w obrębie jajowodu, po wydostaniu się komórki jajowej oraz plemników z pęcherzyka podczas owulacji.

### Podsumowanie

Obie omawiane techniki inseminacyjne wymagają jeszcze wielu badań oraz udoskonaleń, jednakże już na obecnym etapie wiedzy można stwierdzić, iż będą pewną alternatywą w stosunku do konwencjonalnych metod unasienniania. Istnieje prawdopodobieństwo, że w przyszłości mogą stanowić cenne narzędzie w zwalczaniu niektórych przypadków niepłodności u bydła.

### Piśmiennictwo

1. Brüssow K. P., Torner H., Rátky J.: Sperm migration in pigs after deep intrauterine and intraperitoneal insemination. *J. Reprod. Dev.* 2011, 57, 342-345.
2. Hawk H. W., Conley H. H., Wall R. J., Whitaker R. O.: Fertilization rates in superovulating cows after deposition of semen on the infundibulum, near the uterotubal junction or after insemination with high numbers of sperm. *Theriogenology* 1988, 29, 1131-1142.
3. Hawk H. W., Tanabe T. Y.: Effect of unilateral cornual insemination upon fertilization rate in superovulating and single-ovulating cattle. *J. Anim. Sci.* 1986, 63, 551-560.
4. Lopez-Gatius F.: Factors of a noninfectious nature affecting fertility after artificial insemination in lactating dairy cows. A review. *Theriogenology* 2012, 77, 1029-1041.
5. Lopez-Gatius F.: Intraperitoneal insemination in repeat-breeder cows: a preliminary report. *Theriogenology* 1995, 44, 153-158.
6. López-Gatius F., Camón-Urgel J.: Effect of side of insemination on transuterine transport of spermatozoa in superovulated dairy cattle. *Theriogenology* 1990, 33, 843-849.
7. López-Gatius F., Hunter R. H. F.: Intrafollicular insemination for the treatment of infertility in the dairy cow. *Theriogenology* 2011, 75, 1695-1698.
8. López-Gatius F., Urgel J. C., Asensio E. A.: Effects of single deep insemination on transferable embryo recovery rates in superovulated dairy cows. *Theriogenology* 1988, 30, 877-885.
9. Negobatikov G., Zhirnokleev V., Zarudnev S.: An experiment on paragenital insemination of sheep. *Zhivotnovodstvo* 1981, 1, 54-56.
10. Pallares A., Zavos P. M., Hemken R. W.: Fertilization rates and embryonic development in superovulated cattle inseminated in different sites within the reproductive tract. *Theriogenology* 1986, 26, 709-719.
11. Peters J. L., Senger P. L., Rosenberg J. L., O'Connor M. L.: Radiographic of bovine artificial inseminating technique among professional and herdsman-inseminators using .5- and 25-ml french straws. *J. Anim. Sci.* 1984, 59, 1671-1682.
12. Revelli A., Soldati G., Stamm J., Massobrio M., Topfer E., Balerna M.: Effect of volumetric mixtures of peritoneal and follicular fluid from the same woman on sperm motility and acrosomal reactivity in vitro. *Fertil Steril* 1992, 57, 654-660.
13. Rowlands I. W.: Insemination of the guinea-pig by intraperitoneal injection. *J. Endocrinol.* 1957, 16, 98-106.
14. Soldati G. A., Piffaretti A., Medici G., Eppenberger U., Balerna M.: Purification of a factor from human peritoneal fluid that is able to immobilize spermatozoa. *Hum. Reprod.* 1993, 8, 428-436.
15. Sreenan J. M., Diskin M. G.: Early embryonic mortality in the cow: its relationship with progesterone concentration. *Vet Rec.* 1983, 28, 112, 517-521.
16. Yaniz J. L., Lopez-Bejar M., Santolaria P., Rutllant J., Lopez-Gatius F.: Intraperitoneal Insemination in Mammals: A Review. *Reprod. Dom. Anim.* 2002, 37, 75-80.
17. Yaniz J. L., Lopez-Gatius F.: Intraperitoneal Insemination and Retrograde Sperm Transport in Dairy Cows. *J. Vet. Med. A* 2000, 47, 83-88.

Adres autora: lek. wet. Jacek Mrowiec, Pl. Grunwaldzki 49, 50-366 Wrocław; e-mail: jacek.mrowiec@up.wroc.pl