

Animal welfare, etológia és tartástechnológia



Animal welfare, ethology and housing systems

Volume 5

Issue 4

Különszám

Gödöllő
2009



MANGALICA KOCASÜLDŐK LAPAROSZKÓPOS TERMÉKENYÍTÉSE ALACSONY SEJTSZÁMÚ FRISS ÉS FAGYASZTOTT/FELOLVASZTOTT SPERMÁVAL – ELŐKÍSÉRLET

Egerszegi István¹, Sarlós Péter¹, Klaus-Peter Brüßow², Pedro Garcia Casado³, Jekkel Gabriella¹, Rátky József¹

¹Állattenyésztési és Takarmányozási Kutatóintézet, Szaporodásbiológiai Kutatócsoport, 2053 Herceghalom, Gesztenyés u. 1.

²Mezőgazdasági Haszonállat Biológiai Kutatóintézet, Szaporodásbiológiai Osztály, 18196 Dummerstorf, Wilhelm Stahl Allee 2., Németország

³Gestion Veterinaria Porcina, 28400 Madrid C.Villalba, L C/ Calibre, 121., Spanyolország
istvan.egerszegi@atk.hu

Összefoglalás

A modern zootechnikai eljárások alkalmazhatóságának vizsgálata a mangalica tenyésztésében ma már egyrészt gazdasági érdek, másrészt a fajta egyes vonalainak a megőrzésében is szerepet kaphat a jövőben. Korábban sikeresen végeztek mangalica fajtában ivarzás szinkronizálást, laparoszkópos petesejt- és embriókinyerést. Napjainkban a mesterséges termékenyítést, ultrahangos vemhességellenőrzést üzemi szinten alkalmazza számos vállalkozás. Jelen tanulmányban alacsony sejtszámú friss és fagyasztott/felolvasztott mangalica termékenyítőanyag fertilizációs képességét vizsgáltuk kocasüldőkben, mely utóbbiról - tudomásunk szerint - nem jelent meg közlemény. A kísérletben 4 fecskehasú és 6 szőke mangalica koca nemi ciklusát szinkronizáltuk, majd az ovuláció indukciót követő 34. órában laparoszkópos eljárással juttatunk $0,5 \times 10^9$ motilis sejtet tartalmazó termékenyítő anyagot 4, illetve 5 mangalica kocasüldő mindkét méhszarvának utero-tubális-junkció szakaszába. A termékenyítést követő 28. napon hasi ultrahangos vemhességellenőrzést végeztünk. A friss termékenyítő anyaggal inszeminált kocák 80%-a (4), míg a fagyasztott spermával termékenyített egyedek 50%-a (2) volt vemhes a 28. napon. A fialt kocák száma mindkét csoportban kevesebb volt a vemhességi diagnózishoz képest. Az első csoportból 3 koca (60%) fialt le, normális alomlétszámmal (5-6-6 malac). A mélyhűtött spermával történt termékenyítésből 1 koca fialt a fajtára jellemzőnél alacsonyabb számú malacot (2). Az eredmények alapján kijelenthető, hogy alacsony koncentrációjú friss termékenyítőanyagot használva a fajtára jellemző alomszám érhető el egyszeri laparoszkópos



termékenyítéssel, fagyasztott/felolvasztott spermával termékenyítve az 1 milliárd motilis sejtszám - valószínűsíthetően a spermiumok csökkent élethossza és sérülékenyebb sejtmembránja miatt – nem elégséges. A fagyasztott/felolvasztott spermával történő termékenyítésekhez mangalica fajtában az optimális inszemináló dózis meghatározásához további kísérletek szükségesek.

Kulcsszavak: friss és fagyasztott sperma, laparoszópos termékenyítés, mangalica

Laparoscopic insemination of mangalica gilts with low dose fresh and frozen/thawed semen – preliminary study

Abstract

Nowadays the modern zootechnological methods' adaptability in Mangalica breeding has a beneficial interest and otherwise it could be used in preservation of rare blood-line of this breed in the future. Some techniques like estrus synchronization, laparoscopic ovum pick up and embryo transfer were adapted successfully for Mangalica. Several farms use routinely artificial insemination and early pregnancy diagnosis by ultrasound at the present time. Aim of this study was to investigate the fertilizing ability of low concentration fresh and frozen/thawed semen inseminated with laparoscopic method in Mangalica gilts, the last one - in our knowledge - was not published before. Estrus cycle of 4 swallow-belly and 6 blonde Mangalica gilts were synchronized and 34 hours after ovulation induction 0.5×10^9 spermatozoa were inseminated laparoscopically to the utero-tubal-junction part of each uterine horns in 4 and 5 of the gilts. Pregnancy diagnosis was carried out on the 28. days after insemination by transcutan ultrasonography. Eighty percent (4) of the gilts inseminated with fresh semen were pregnant, whilst only half (2) of the frozen/thawed group had positive diagnosis after pregnancy-check. Number of farrowing sows is decreased compared to the results on day 28. Three sows from the first group gave birth to 5-6-6 piglets. Unfortunately only one sow farrowed from the frozen/thawed group with low litter size (2 piglets). It could be concluded that normal litter size can be obtained with single laparoscopic insemination low dose (1×10^9) fresh semen; however with frozen semen the same concentration is not adequate may be the shorter life time and more sensitive plasma membranes of these cells. Further experiments are needed to determine optimal concentration of frozen/thawed semen insemination dose in Mangalica.

Keywords: fresh and frozen/thawed semen, laparoscopic insemination, mangalica



Irodalmi áttekintés

A gazdaságos sertésstenyésztés egyik sarokpontja a szaporodásbiológiai folyamatok kézbentartása, ennek fontos eleme a mesterséges termékenyítés. A fejlett sertésstartással rendelkező országokban a mesterséges termékenyítést az állományok 70-75%-ban alkalmazzák, hazánkban ez az arány nem éri el az 50%-ot (Wekerle, 2003). A mesterséges termékenyítéskor általánosan dózisonként 80-100 ml hígított ejakulátumot (2-4 milliárd spermiumot) juttatnak két alkalommal cervikális úton a koca méhébe, ami ejakulátumonként 10-20 koca kétszeri termékenyítését teszi lehetővé. A nagy genetikai értékkel bíró kanok megfelelő kihasználása érdekében folyamatos dolgoznak az inszeminálás technológiai fejlesztésén. Az ejakulátumok gazdaságos felhasználására a dózisonkénti spermiumszám, illetve a termékenyítések számának csökkentése lehet a megoldás. Míg az első esetben a termékenyítés technikájának/kivitelezésének módosítása az előfeltétel az utóbbinál az ovuláció időpontjának minél pontosabb ismerete a legfontosabb tényező (Martinez és mtsai, 2001, 2002; Rozeboom és mtsai, 2004; Serret és mtsai, 2005; Viana és mtsai, 2006; Pelland és mtsai, 2008; Vigo és mtsai, 2009). Mélyhűtött sperma felhasználásakor az inszeminálás technikája és az időpontja fokozottan fontos, hiszen a felolvasztás után a spermiumok csak mintegy fele marad életben és az élettartamuk is csupán 4-6 órára tehető (Rath és mtsai, 2009). Az alkalmazott technikák közül igen jó eredményeket értek el a deep uterin módszerrel $1-2 \times 10^9$ / ml koncentrációjú dózissal termékenyítve (Bathgate és mtsai, 2005, 2008; Vazquez és mtsai, 2008). A spermiumszám tovább csökkenthető a laparoszkópos termékenyítés alkalmazásakor, habár a módszer költséges mivolta elsősorban kísérleti felhasználását teszi lehetővé (Morcom és Dukelow, 1980; Fantinati és mtsai, 2005).

A mélyhűtött sperma felhasználása a modern, csúcs-genetikájú kanok export-importján kívül szerepet kaphat az őshonos sertésfajták megőrzésében is. Őshonos sertésünk a mangalica estében a fagyasztott/felolvasztott spermával történő termékenyítésekhez szükséges legtöbb modern reprodukciós eljárás adaptálása az elmúlt években megtörtént - ivarzás szinkronizálás (Rátky és Brüßow, 1998); mesterséges termékenyítés, ultrahangos petefészkek és vemhesség vizsgálat, sperma mélyhűtés (Egerszegi és mtsai, 2007, 2008; 2009) - azonban a módszer gyakorlati alkalmazása előtt az optimális inszemináló dózis meghatározása szükségeltetik.

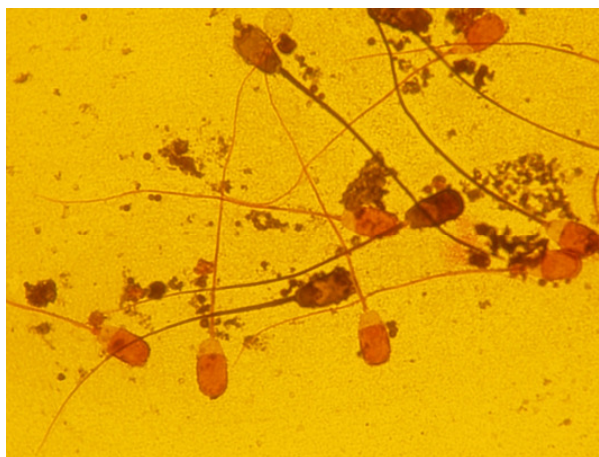
Ezek alapján a kísérlet célja volt a deep-uterin alacsony dózisú termékenyítés modellezése laparoszkópos eljárással friss és fagyasztott termékenyítőanyag felhasználásával, a módszer későbbi adaptálásához.

Anyag és Módszer

A kísérleteket az Olmos és Tóth Kft. Emőd Istvánmajor-i mangalica törzstelepén végeztük. Összesen 10 mangalica kocasüldő (11-12 hónapos, 95-105 kg-os) ivari ciklusát szinkronizáltuk Regumate®-val (15 nap 20 mg /állat, Janssen) és 1000 NE PMSG-vel (Folligon, Intervet) (Rátky és Brüssow, 1998). 80 órával a PMSG kezelés után applikált 50 µg GnRH-val (Fertagyl, Intervet) ovuláció indukciót végeztünk. Az endoszkópos termékenyítést megelőzően a preovulációs tüszőket és méh állapotát transzkután ultrahangos vizsgálattal (Pie Medical Falco-100, Maastricht, 5-7,5 MHz-es konvex vizsgálófejjel) ellenőriztük.

A vizsgálatban 2, korábban a friss sperma minőségére (>80% 0 órás és >70% 24 órás motilitás, <10% defektes spermium) és a termékenyítőanyag mélyhűthetőségére szelektált (>55% felolvasztás utáni motilitás) mangalica kant használtunk. A sperma mélyhűtését Egerszegi és mtsai (2009) által leírt módon végeztük. Az ejakulátumot a mikroszkópos motilitás vizsgálatot követően 1:1 arányban hígítottuk Standard (Pigletplusz 2004 Kft.) hígítóval majd 15 °C-on inkubáltuk 3 órán keresztül, miután 400 x g-vel 15 °C-on 10 percig centrifugáltuk. A pelletet laktóz-tojássárgája hígítóval (LEY) szuszpendáltuk és 5°C-on 2 órán át inkubáltuk, ezt követően LEY+glicerin+equex es paste keverékével állítottuk be a végkoncentrációt 10^9 spermium/ml és 2% glicerin. A termékenyítőadagot 0,5 ml-es szalmákba töltöttük, majd nitrogén gőzben 8 perces fagyasztást követően -196°C-on tároltuk. A minták motilitását 38°C-on 20 másodpercig tartó felolvasztás és 10 percig 38°C-on inkubálás után ellenőriztük. A spermiumok morfológiáját, az élő/elhalt sejtek arányát és az akroszóma státuszát Kovács és Foote-féle festéssel (1992) értékeltük (1. kép). A laparoszkópos termékenyítéshez a friss illetve a fagyasztott/felolvasztott ejakulátumból is 10^9 motilis sejtet tartalmazó adagot használtunk fel.

A laparoszkópos termékenyítést a GnRH injektálás után 34 órával végeztük Brüssow és mtsai (2006) által alább leírt módon. Az állatokat a műtét előtt 24 órán keresztül koplaltattuk, majd a műtéti narkózist 100 testsúly kg-onként 10 ml ketamin (SBH-Ketamin, SelBruha) és 4 ml xylazin (Xylavet, Lavet) injekcióval biztosítottuk. Az altatott állatokat Trendelenburg-helyzetben rögzítettük a műtőasztalon, majd a fertőtlenített hasfalon keresztül beszúrtuk a Veress-féle tűt, és az endoszkópos inszuflátor (Olympus) segítségével CO₂-dal töltöttük fel a hasüreget a medenceüregi szervek jobb áttekinthetősége érdekében. További három, a hasfalon ejtett bőrmetszésen keresztül az optikai teleszkópot (Olympus) és a manipulátort, illetve az inszemináló pisztolyt bevezettük az állatok hasüregébe. A beavatkozást monitoron követtük nyomon. A méhszarv csúcsi részét 10 cm-re az uterotubális junkciótól a manipulátor segítségével rögzítettük, majd a friss vagy az előzőleg felolvasztott mélyhűtött termékenyítőanyagot ($2 \times 0,5 \times 10^9$) a méhszarvba infundáltuk (2.kép).



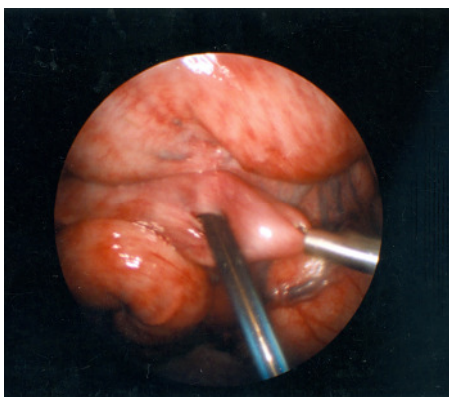
1. kép: Fagyasztott/felolvasztott mangalica spermiumok élő/elhalt festéssel

Picture 1. Frozen/thawed Mangalica spermatozoa after live/dead staining

A műtétet követően a süldők egyedi kutyicában 2-3 napi kímélő takarmányozás mellett antibiotikumos utókezelést kaptak. A termékenyítést követő 28. napon a vemhességet transzcután ultrahang vizsgálattal (Ambisea AV-2100 hordozható ultrahangos készülék, 3,5 MHz-es szektor fejjel, 3. kép) ellenőriztük. A kocák fialását követően az alom adatokat rögzítettük.

Eredmények és értékelés

A kísérletben 4 fecskehasú és 6 szőke mangalica kocasüldő nemi ciklusát szinkronizáltuk. Az állatok genitáliájának preovulációs időszakban végzett ultrahangos ellenőrzésekor 1 állatnál cisztás petefészket és méhgyulladásra utaló elváltozást tapasztaltunk, így kizártuk a további kísérletből. A szinkronizálás eredménye megegyezett a korábbi, mangalicával végzett kísérletekben tapasztaltakkal (Brüssow és mtsai, 2005), bár a cisztás elváltozás elsősorban a magasabb dóziszú PMSG (szuperovulációs) kezeléseknél alakult ki nagyobb gyakorisággal e fajtában (Rátky és mtsai, 2001). Az ovuláció indukciót követő 34. órában laparoszkópos eljárással juttatunk $0,5 \times 10^9$ motilis sejtet tartalmazó termékenyítő anyagot, 5 (friss spermás csoport - F) illetve 4 (fagyasztott/felolvasztott csoport - FF) mangalica kocasüldő mindkét méhszarvának utero-tubális-junkció szakaszába. A felhasznált ejakulátumokban motilis- és az élő-ép akroszómájú spermiumok aránya eltérő volt a két csoport között, 80% és 75% (F) illetve 50% és 42% (FF). Az általunk fagyasztott mangalica sperma felolvasztás utáni minőségi paraméterei megegyeztek a modern fajtáknál korábban leírt eredményekkel (Grossfeld és mtsai, 2008; Rath és mtsai, 2009). A termékenyítést követő 28. napon hasi ultrahangos vemhességellenőrzést végeztünk. A friss termékenyítő anyaggal inszeminált kocák 80%-a (4), míg a fagyasztott spermával termékenyített egyedek 50%-a (2) volt vemhes a 28. napon.



2. kép: Laparoszkoópos inszeminálás

Picture 2. Laparoscopic insemination



3. kép: 28 napos vehem (3,5 MHz)

Picture 3. Day 28 of pregnancy (3.5 MHz)

A fiatal kocák száma mindkét csoportban kevesebb volt a vemhességi diagnózishoz képest. Az első csoportból 3 koca (60%) fiatal le, normális alomlétszámmal (5-6-6 malac). A mélyhűtött spermával történt termékenyítésből 1 koca fiatal a fajtára jellemzőnél alacsonyabb számú malacot (2). A F csoport eredménye valamivel meghaladja az általunk mangalicánál tapasztalt normál (cervikális) inszeminálást követő vemhességi eredményeket, a fiatalok ráta pedig csaknem megegyezik azzal (Egerszegi, nem publikált adatok). Az FF csoport vemhességi aránya és fiatalok száma a modern fajtáknál e módszer bevezetésekor elért eredményeknek felel meg (Morcom és Dukelow, 1980; Johnson és mtsai, 1981,1982). A friss spermával történő termékenyítéstől alig különböző legújabb publikált adatok - > 70% fiatalok aránya és >9 élve született malac/alom – jóval meghaladják saját eredményeinket (Roca és mtsai, 2003; Bathgate és mtsai, 2008).

Következtetések és javaslatok

Az eredmények alapján kijelenthető, hogy alacsony koncentrációjú friss termékenyítőanyagot használva a fajtára jellemző alomszám érhető el egyszeri laparoszkoópos termékenyítéssel. Fagyasztott/felolvasztott spermával termékenyítve az 1 milliárd motilis sejtszám - valószínűsíthetően a spermiumok csökkent élethossza és sérülékenyebb sejtmembránja miatt – nem elégséges. A fagyasztott/felolvasztott spermával történő termékenyítésekhez mangalica fajtában az optimális inszemináló dózis meghatározásához további kísérletek szükségesek.

A vizsgálatokat az NKTH Déri Miksa programjának OMFB-00507/2007 keretében végeztük. Köszönet az Olmos és Tóth Kft. munkatársainak a kísérletben nyújtott technikai segítségért.



Irodalomjegyzék

- Bathgate R., Eriksson, B., Maxwell, W.M.C., Evans, G. (2005) Low dose deep intrauterine insemination of sows with fresh and frozen-thawed spermatozoa *Theriogenology* 63, 553-554.
- Bathgate, R., Grossfeld, R., Susetio, D., Ruckholdt, M., Heasman, K., Rath, D., Evans, G., Maxwell, W.M.C. (2008) Early pregnancy loss in sows after low dose, deep uterine artificial insemination with sex-sorted, frozen-thawed sperm *Anim Reprod Sci* 104, 440-444.
- Brüssow, K. P., Egerszegi, I., Rátky, J., Torner, H., Tóth, P., Schneider, F. (2005) Reproduction in the Hungarian Mangalica pig – a review. *Pig News and Information* 26, 23N-28N.
- Brüssow, K.P., Torner, H., Rátky, J., Manabe, N., Tuchscherer, A. (2006) Experimental evidence for the influence of cumulus-oocyte-complexes on sperm release from the porcine oviductal sperm reservoir. *J Reprod Dev* 52, 249-257.
- Egerszegi, I., Brüssow, K.P., Sarlós, P., Tóth, P., Rátky J. (2008) Effect of early pregnancy diagnosis on reproductive performance in native Mangalica pigs *Reprod Dom Anim* 43 S5, 91.
- Egerszegi, I., Hazeleger, W., Rátky, J., Sarlós, P., Kemp, B., Bouwman, E., Solti, L., Brüssow, K-P. (2007) Superovulatory ovarian response in Mangalica gilts is not influenced by feeding level. *Reprod Dom Anim* 42, 441-444.
- Egerszegi, I., Sarlós, P., Berger, B., Rátky, J. (2009) Cryopreservation of semen from native Hungarian Mangalica boars – a pilot study VIII. International Conference on Pig Reproduction Banff, Canada, 125.
- Fantinati, P., Zannoni, A., Bernardini, C., Webster, N., Lavitrano, M., Forni, M., Seren, E. Bacci M. (2005) Laparoscopic insemination technique with low numbers of spermatozoa in superovulated prepuberal gilts for biotechnological application *Theriogenology* 63, 806-817.
- Grossfeld R., Sieg, B., Struckmann, C., Frenzel, A., Maxwell, W.M., Rath, D. (2008) New aspects of boar semen freeing strategies *Theriogenology* 70, 1225-1233.
- Johnson, L. A., Aalbers, J. G., Arts, J.A.M. (1982) Use of boar spermatozoa for artificial insemination II. Fertilizing capacity of fresh and frozen spermatozoa in gilts inseminated either at a fixed time or according to walsmeta readings *J Anim Sci* 54, 126-131.
- Johnson, L. A., Aalbers, J. G., Willems C.M.T., Sybesma W. (1981) Use of Boar Spermatozoa for Artificial Insemination. I. Fertilizing Capacity of Fresh and Frozen Spermatozoa in Sows on 36 Farms *J Anim Sci* 52, 1130-1136.
- Kovács, A., Foote, R.H. (1992) Viability and acrosome staining of bull, boar and rabbit spermatozoa *Biot Histoc* 67, 119-124.
- Martinez, E.A., Vazquez, J.M., Roca, J., Lucas, X., Gil, M.A., Parrilla, I., Vazquez, J.L., Day B.N. (2001) Successful non-surgical deep intrauterine insemination with small numbers of spermatozoa in sows *Reproduction* 122, 289-296.



- Martinez, E.A., Vazquez, J.M., Roca, J., Lucas, X., Gil, M.A., Parrilla, I., Vazquez, J.L., Day B.N. (2002) Minimum number of spermatozoa required for normal fertility after deep intrauterine insemination in non-sedated sows *Reproduction* 123, 163-170.
- Morcom C.B., Dukelow, W.R. (1980) A research technique for the oviductal insemination of pigs using laparoscopy *Lab Anim Sci* 30, 1030-1.
- Pelland, C., Cassar, G., Kirkwood, R., Fiendship, R. (2008) Fertility after intrauterine insemination with conventional or low numbers of spermatozoa in sows with synchronized ovulation. *J Swine Health Prod.* 16, 188–192.
- Rath, D., Bathgate, R., Rodriguez-Martinez, H., Roca, J., Strzezek, J., Waberski, D. (2009) Recent advances in boar semen cryopreservation In: *Control of pig reproduction VIII* Eds: Rodriguez-Martinez, H., Vallet, J.L., Ziecik, A.J. Nottingham University Press
- Rátky, J., Brüssow, K.P. (1998): Ovarian activity in gilts including some characteristics of a native breed. *Reproduction Domestic Animal* 33, 219-222.
- Rátky, J.; Brüssow, K.P., Solti, L., Torner, H., Sarlós, P. (2001) Ovarian response, embryo recovery and results of embryo transfer in a Hungarian native pig breed *Theriogenology* 56, 969-978.
- Roca, J., Carvajal, G., Lucas, X., Vazquez, J.M., Martinez, E.A. (2003) Fertility of weaned sows after deep intrauterine insemination with reduced number of frozen-thawed spermatozoa *Theriogenology* 60, 77-87.
- Rozeboom, K.J., Reicks, D.L., Wilson, M.E. (2004) The reproductive performance and factors affecting on-farm application of low-dose intrauterine deposit of semen in sows *J Anim Sci* 82, 2164-2168.
- Serret C.G., Alvarenga, M.V.F., Cória, A.L.P., Dias, C.P., Corcini, C.D., Correa, M.N., Deschamps, J.C., Bianchi, I., Lucia Jr., T. (2005) Intrauterine artificial insemination of swine with different sperm concentrations, parities, and methods for prediction of ovulation *Anim Reprod* 2, 250-256.
- Vazquez, J.M., Roca, J., Gil, M.A., Cuello, C., Parilla, I., Vazquez, J.L., Martinez, E.A. (2008) New developments in low-dose insemination technologies *Theriogenology* 70, 1216-1224.
- Viana, C.H.C., Candini, P.H., Gama, R.D., Carbone, A., Barnabe, R.C. (2006) Effect of insemination-to-induced ovulation interval on fertilization rate, embryo viability and number of accessory sperms in sows *Braz J Vet Res Anim Sci* 43, 132-138.
- Vigo, D., Faustini, M., Villani, S., Orsini, F., Bucco, M., Chlapanidas, T., Conte, U., Ellis, K., Torre, M.L. (2009) Semen controlled-release capsules allow a single artificial insemination in sows *Theriogenology* 72, 439-444.
- Wekerle, L. (2003) A sertés szaporodása és szaporítása *A Sertés könyvek* Nedvet Bt., Budapest