



Undersøgelser over effekten af intrauterin sensibilisering på frugtbarheden hos gylte

Investigations of the Effect of Intrauterine Sensitization on Fertility of Gilts

*J.H. Meding, P.E. Kruse og G. J. Coenen
Afd. for Forsøg med Svin og Heste*

STATENS HUSDYRBRUGSFORSØG
Forskningscenter Foulum, Postboks 39, 8830 Tjele
Tlf.: 89 99 19 00. Fax: 89 99 19 19

Statens Husdyrbrugsforsøg, oprettet 1883, er en institution under Landbrugsministeriet.

Institutionen har til formål at gennemføre forskning og forsøg og opbygge viden af betydning for erhvervsmæssigt husdyrbrug i Danmark og bidrage til en hurtig og sikker formidling af resultater til brugerne.

Der skal i forsknings- og forsøgsarbejdet lægges vægt på ressourceudnyttelse, miljø og dyrevelfærd samt husdyrprodukternes kvalitet og konkurrenceevne.

Institutionen er opdelt i fem forskningsafdelinger, et Centrallaboratorium, en Afdeling for Landbrugsdrift og et Sekretariat. Forskningsafdelingerne omfatter Afd. for Dyrefysiologi og Biokemi samt fire dyreartsorienterede afdelinger: Afd. for Forsøg med Kvæg og Får, Afd. for Forsøg med Svin og Heste, Afd. for Forsøg med Fjerkræ og Kaniner samt Afd. for Forsøg med Pelsdyr.

Abonnement på Statens Husdyrbrugsforsøgs Forskningsrapporter, Beretninger og Informationsblad kan tegnes ved direkte henvendelse til Statens Husdyrbrugsforsøg på ovenstående adresse.

NATIONAL INSTITUTE OF ANIMAL SCIENCE
Research Centre Foulum, P.O. Box 39, DK-8830 Tjele
Tel: +45 89 99 19 00. Fax: +45 89 99 19 19

The National Institute of Animal Science was founded in 1883 and is a governmental research institute under the Ministry of Agriculture.

The aim of the institute is to carry out research and accumulate knowledge of importance to Danish animal husbandry and to contribute to an efficient implementation of the results to the producers.

In the research great importance is attached to the utilization of resources, environment and animal welfare and to the quality and competitiveness of the agricultural products.

The National Institute of Animal Science comprises five research departments, a Central Laboratory, a Department for Farm Management and Services, and a Secretariat. The research departments comprise: Dept. for Animal Physiology and Biochemistry, Dept. for Research in Cattle and Sheep, Dept. for Research in Pigs and Horses, Dept. for Research in Poultry and Rabbits, and Dept. for Research in Fur Animals.

For subscription to reports and other publications please apply directly to the above address.

Forskningsrapport nr. 12/1993
fra Statens Husdyrbrugsforsøg

Report No. 12/1993

from the National Institute of Animal Science, Denmark

Undersøgelser over effekten af intrauterin sensibilisering på frugtbarheden hos gylte

*Investigations of the Effect of Intrauterine Sensitization on
Fertility of Gilts*

*J.H. Meding, P.E. Kruse og G. J. Coenen
Afd. for Forsøg med Svin og Heste*

Forskningscenter Foulum 1993

Manuskriptet afleveret august 1993

Trykt i Frederiksberg Bogtrykkeri a/s 1993

Indholdsfortegnelse

Sammendrag	5
Summary	6
1 Indledning	7
2 Materiale og metode	9
3 Resultater	10
4 Diskussion	11
5 Konklusion	12
Anerkendelser	13
Litteratur	14

Contents

Danish summary	5
English summary	6
1 Introduction and purpose	7
2 Materials and methods	9
3 Results	10
4 Discussion	11
5 Conclusion	12
Acknowledgements	13
References	14

Sammendrag

Sopotte blev i deres første erkendte brunst sensibiliseret ved intrauterin infusion af henholdsvis dræbte ornesædceller, bovin serum albumin (BSA-L), svinelymfocytter samt sædfortyndingsvæske og insemineret i den følgende brunst 19-24 dage senere. Seks uger efter insemineringen blev dyrene slagtet og antallet af

gule legemer og fostre samt disses vægt registreret.

Der kunne ikke påvises signifikante forskelle mellem de forskellige behandlingsgrupper i overlevelsesrate af fostre eller i disses gennemsnitsvægt, men der var en tendens til flere implanterede fostre efter sensibilisering.

Nøgleord: Intrauterin sensibilisering, kuldstørrelse, immunologi, svin.

Summary

Gilts, litter mates, in their first recognized heat were sensitized by intrauterine infusion of one of the following agents: Bovine Serum Albumine (BSA-L), killed boar sperms, swine lymphocytes or EDTA-semendiluter, and inseminated in their following heat 19-24 days later. Six weeks after the insemination the animals

were slaughtered and the number of corpora lutea and embryos and weight of embryos were recorded. No significant differences in survival rate or average weight between the different groups of treatment could be demonstrated, but a tendency to a higher number of implanted embryos after sensitization could be seen.

Key words: Intrauterine sensitization, fertility, litter size, immunology, swine.

1 Indledning

Immunologiske mekanismer i reproduktionsprocesserne har i de senere år påkaldt sig betydelig interesse. Forsøg med laboratoriedyr har bl.a. vist, at lokal allogen sensibilisering af uterus hos hunrotter med antigener fra det til paringen benyttede handyr forøgede såvel kuldstørrelse som fostervægt, hvorimod en systemisk immunisering med de samme antigener ikke havde en sådan effekt (Beer og Billingham, 1976). Ved systemisk (subcutan) immunisering af mus med alloge lymfocytter fandt Vorting (1987) derimod, at såvel kuldstørrelse som vægt forøgedes sammenlignet med kontrolgruppen, som var immuniseret med syngene lymfocytter. Ved forsøg med sopolte fandt Skjervold et al. (1979) og Almlid (1981), at intrauterin stimulation af uterus med leukocyter i tilslutning til inseminering forøgede kuldstørrelsen med ca. 11% efter fem ugers drægtighed, sammenlignet med kontrolgruppen. Disse resultater kunne ikke reproducere af Meding (1983) eller af Blichfeldt (1984), som efter tilsætning af forskellige antigener, bl.a. kvægleukocyter, adjuvantia og mitogener til insemineringsdosis ikke kunne påvise signifikant forøgelse af hverken drægtighedsprocent eller kuldstørrelse hos de inseminerede sopolte.

Medens der i ovennævnte undersøgelser opereredes med en forøgelse af antigeniciteten af selve insemineringsdosis, forsøgte Murray et al. (1983, 1986) og Cheng et al. (1985) at sensibilisere sopolte intrauterint med levende eller dræbte sædceller forud for løbning/inseminering. De fandt i deres undersøgelser en signifikant forbedring af kuldstørrelsen hos de sensibiliserede sopolte. Cheng et al. (1985) viste endvidere, at intrauterin infusion af 50 ml fysiologisk kogsaltopløsning også forbedrede kuldstørrelsen signifikant, men ikke så meget som infusion med dræbte sædceller. De signifikante forbedringer skal vurderes med forbehold, idet kontrolgruppen kun opnåede en gennemsnitlig kuldstørrelse på 6,6 mod 11,2 og 10,0 for henholdsvis infusion med dræbte sædceller og salt-

vand. Han et al. (1988) opnåede ligeledes en signifikant forbedring af kuldstørrelsen efter sensibilisering af sopolte med sædceller forud for løbning og en mindre, ikke-signifikant forbedring efter sensibilisering med sædplasma, sammenlignet med en ikke-immuniseret kontrolgruppe. Hele materialet omfattede dog kun 37 sopolte. I en lignende undersøgelse omfattende ialt 36 sopolte fandt Erices et al. (1990) derimod ingen signifikant forskel i antal embryoner 23-25 dage efter løbning mellem kontrolgruppen og grupperne sensibiliseret med henholdsvis frosset sæd eller sædplasma fra en vasektomeret orne. Den procentuelle embryonale overlevelsesrate var dog højere i forsøgsgrupperne end i kontrolgruppen (henholdsvis 83,4%, 88,2% og 75%). Gooneratne og Thacker (1989) fandt i en undersøgelse med intrauterin infusion af dræbte sædceller i brunstperioden en signifikant forbedring af drægtighedsprocenten sammenlignet med kontrolgruppen (82% vs. 63,3%), men ingen forbedring af kuldstørrelsen. Sluttelig skal nævnes, at i en dansk undersøgelse (Kjeldsen, 1988) fremkom der en tendens til forbedring af kuldstørrelsen på 0,5 - 0,8 gris ved infusion af dræbte sædceller forud for inseminering.

I de refererede undersøgelser har man benyttet sig af to metoder til at fremkalde en immunreaktion hos hundyret, enten ved en forøgelse af antigeniciteten af selve insemineringsdosis eller ved en forudgående sensibilisering af uterus med et antigen før løbning. I begge tilfælde en behandling, som kan tænkes at ændre dyrenes immunologiske status med deraf følgende indvirkning på frugtbarheden.

En forøgelse af sopoltes frugtbarhed ved manipulation af immunreaktionerne i forbindelse med løbning og drægtighed er ikke uden interesse for svineproduktionen, hvor 25-30% af hundyrene i en sobesætning udgøres af sopolte. Da disse ofte først løbes i deres anden eller tredje brunst af hensyn til opnåelse af optimal kuldstørrelse m.v., ville en præsensibilisering af

sopoltene forud for løbning kunne anvendes med fordel uden forsinkelse af gyltens farings-tidspunkt.

Da de hidtidigt opnåede resultater med intrauterin antigen stimulering af sopolte synes

for usikre og modstridende til, at metoden på nuværende tidspunkt kan tages i brug, blev der på Forskningscenter Foulum foretaget en undersøgelse af effekten af antigen stimulering af uterus forud for løbning.

2 Materiale og metode

Sopolte, kuldsøstre, blev i deres første erkendte brunst behandlet på én af følgende måder:

- a) Intrauterin infusion af ca. 8×10^9 dræbte (frosne) sædceller i EDTA-sædfortyndingsvæske, ad 60 ml.
- b) Intrauterin infusion af 100-200 $\times 10^6$ lymfocytter i EDTA-sædfortyndingsvæske, ad 60 ml.
- c) Intrauterin infusion af 20 ml BSA-L i EDTA-sædfortyndingsvæske, ad 60 ml.
- d) Intrauterin infusion af 60 ml EDTA-sædfortyndingsvæske.
- e) Ingen behandling (kontrol).

I den følgende brunst 19-24 dage senere blev sopoltene insemineret to gange med 18-24 timers mellemrum og iøvrigt behandlet ens (fodring, opstaldning m.v.). Ca. seks uger efter insemineringen blev dyrene slagtet, og antallet af gule legemer og fostre samt disses vægt registreret.

De til infusionen anvendte sædceller, som stammede fra andre orner end de, der blev benyttet til inseminering, blev behandlet på følgende måde: Efter opsamling, filtrering og koncentrationsbestemmelse centrifugeredes sæden 2000 omdr./min. i 10 minutter. Supernatanten fjernedes og sædcellerne resuspenderedes i EDTA-sædfortyndingsvæske tilsat 2% glycerol og 1 mg neomycinsulfat/ml, fordeltes i enkeltdoser indeholdende ca. 8×10^9 sædceller pr. 10 ml, og blev derefter opbevaret ved -20°C indtil brugen. Umiddelbart før infusion i uterus blev en dosis optøet og overført til 50 ml EDTA-sædfortyndingsvæske.

Lymfocytterne til infusionen blev behandlet på følgende måde:

EDTA-stabiliseret fuldblod fra svin tilsattes en 6% dextranopløsning til "fældning" af erythrocyterne. Efter 45 minutters henstand afpi-

petteredes supernatanten med lymfocytterne, anbragtes på Lymfoprep og centrifugeredes 2500 omdr./min. i 25 minutter, hvorefter lymfocytlaget afpipetteredes og overførtes til glas med Hanks opløsning. Efter tilsætning af NH_4Cl og inkubering v. 37°C i 7 minutter, centrifugeredes der 2000 omdr./min. i 10 minutter. Supernatanten fjernedes, og lymfocytterne blev vasket to gange i Hanks opløsning. De vaskede lymfocytter fordeltes herefter på enkeltdoser à 100-200 $\times 10^6$ lymfocytter i 10 ml Hanks opløsning og blev opbevaret ved 5°C indtil brugen. (Max. opbevaringstid: 7 dage). Umiddelbart før infusion i uterus opslemmedes en lymfocytosis i 50 ml EDTA-sædfortyndingsvæske.

BSA-L blev fremstillet på følgende måde:

500 mg BSA opløstes i 50 ml 0,9% natriumkloridopløsning, hvorefter der tilsattes 50 ml aldehydgel (Aluminium Hydroxyd Gel) som adjuvans. Blanding i 12-24 timer. Opbevaring ved 5°C indtil brugen. (Max. 7 dage). Umiddelbart før infusionen overførtes 20 ml af BSA-L til 40 ml EDTA-sædfortyndingsvæske.

EDTA-sædfortyndingsvæsken havde følgende sammensætning:

Glucose	60,00 g
Natriumedetat	3,70 g
Natriumcitrat, 2 ml H_2O	3,75 g
Natriumbicarbonat	1,20 g
Destilleret vand	1000,00 g

Forsøget blev opgjort ved hjælp af maksimum likelihood metoden, og der blev i den statistiske model korrigeret for blok, orne, samt antal gule legemer.

3 Resultater

Tabel 1. Intrauterine sensibiliserings indflydelse på frugtbarheden hos gylte
Influence of intrauterine sensitization on fertility of gilts

antigen	antal kuld no. litters	antal gule legemer no. of corp. lut.	antal fostre no. of embryos	overlev.- rate % survival rate %	gns.alder dg. fostre av. age, days. of embryos
dræbte sædceller <i>killed sperms</i>	21	14.8	11.8	79.7	42.8
BSA-L	18	14.9	11.9	79.9	42.8
lymfocytter <i>lymfocytes</i>	18	14.9	9.8	68.1	42.9
EDTA-sædfortyndingsvæske <i>EDTA-diluter</i>	14	14.6	11.1	76.0	43.2
kontrol	24	14.0	10.4	74.3	43.0
ialt/gns./total av.	95	14.5	11.0	75.9	42.9

I tabel 1 er vist de opnåede resultater efter præsensibilisering med dræbte sædceller, BSA-L, lymfocytter og EDTA-sædfortyndingsvæske, samt for et kontrolhold. Det ses, at antallet af gule legemer har været næsten ens for de forskellige hold, varierende fra 14,0 til 14,9. Derimod har antallet af implanterede fostre udvist en variation fra 11,9 til 9,8, hvilket har resulteret i en variation i overlevelseshraten fra 79,9 til 68,1% for holdene sensibiliseret med henholdsvis BSA og lymfocytter. Ingen af de fundne forskelle er imidlertid signifikante. Der kunne ikke påvises signifikante forskelle i fostrenes gennemsnitsvægt mellem de forskellige behandlinger efter korrektion til samme alder.

I tabel 2 er vist estimerede behandlingsgennemsnit for en gennemsnitsor og en gennemsnitsso med 14 gule legemer. Det ses, at det primært er efter immunisering med lymfocytter, der forekommer en afvigende overlevelseshrate, men de konstaterede forskelle mellem grupperne er som omtalt ikke signifikante.

Tabel 2. Estimerede behandlingsgennemsnit med en gennemsnitsor og en gennemsnitsso med 14 gule legemer

Estimated average of treatment with an average boar and an average sow with 14 corp. lut.

antigen	antal kuld no. litters	antal fostre no. of embryos	overlevelseshrate % survival rate %
dræbte sædceller <i>killed sperms</i>	21	12.8	85.1
BSA-L	18	12.5	83.6
lymfocytter <i>lymfocytes</i>	18	11.3	75.1
EDTA-sædfortyndings- væske <i>EDTA-diluter</i>	14	12.5	83.6
kontrol	24	12.2	81.6

4 Diskussion

Den foreliggende undersøgelse har ikke kunnet dokumentere en signifikant forbedring af frugtbarheden efter intrauterin sensibilisering af so-polte forud for løbning (Tabel 1). Efter korrektion for antal gule legemer og de anvendte orner og søer er de fundne forskelle heller ikke signifikante (Tabel 2). Der er dog en tendens til en forbedring af frugtbarheden efter sensibiliseringerne. Således er der efter behandling med dræbte sædceller konstateret 0,6 flere implanterede fostre/kuld sammenlignet med kontrolholdet.

Den bemærkelsesværdigt lave overlevelseshastighed efter sensibilisering med lymfocytter er i modstrid med tidligere lignende undersøgelser hos svin (Skjervold et al. 1979; Almid, 1981). En forklaring kan være, at lymfocytterne i de norske undersøgelser blev tilsat selve insemineringsdosis. Lymfocytter brugt til svin, som i den foreliggende undersøgelse, er ikke tidligere rapporteret. Det er en kendsgerning, at forskellige antigener også har forskellig immuniserende effekt afhængig af forskellige forhold. Kan antigenet f.eks. ikke optages gennem slimhinden til de immunogene områder, vil den antigene effekt være væsentligt ændret. Dette forhold kunne være en del af forklaringen på, at sensibilisering med lymfocytter havde en noget afvigende effekt. Tilsyneladende er den sensibiliserende effekt af lymfocytter størst, hvis de sættes direkte til insemineringsdosis (Skjervold et al. 1979; Almid 1981), men ud fra et praktisk synspunkt vil det imidlertid være nemmere at anvende andre antigener end lymfocytter til denne insemineringsmåde.

Mange undersøgelser har efterhånden peget på, at en eller anden form for modulering af immunapparatet er nødvendig for, at moderdyret rent immunologisk kan acceptere embryonerne og en drægtighed gennemføres, uden at fostrene afstødes ved en immunreaktion (Beer og Billingham, 1976). Om den forbedrede frugtbarhed, som af og til ses efter immuniseringer, direkte skyldes immunologiske forhold, eller også skal tilskrives en forbedring af fostrenes uterine miljø, er der ikke nogen entydig forklaring på endnu. I flere undersøgelser på mus er der f.eks. rapporteret om en øget placenta vægt efter præsensibiliseringer, som kunne skyldes en sekundær immunologisk effekt, men også kunne være resultatet af en almindelig mekanisk påvirkning af uterus (Beer og Billingham, 1976). Dette kunne måske være forklaringen på, at gyltene, som kun blev sensibiliseret med EDTA-sædfortyndingsvæske i denne undersøgelse, også udviste en svag forbedring af frugtbarheden sammenlignet med kontrolholdet. En mulig forbedring i fostrenes forsyning med næringsstoffer efter de forskellige immuniseringer har imidlertid ikke medført signifikante forskelle i fostrenes vægt, således som det er fundet i undersøgelser med mindre forsøgsdyr (Beer og Billingham, 1976).

Resultaterne har således ikke bekræftet, at intrauterin sensibilisering kan medføre øget kuldstørrelse. Yderligere undersøgelser er nødvendige for at belyse grundlaget for anvendelsen af denne behandlingsteknik.

5 Konklusion

I den foreliggende undersøgelse har intrauterin infusion af sopolte forud for løbning med dræbte sædceller, BSA-L, lymfocytter eller fortyn-

dingsvæske ikke signifikant kunnet forbedre frugtbarheden.

Anerkendelser

Forsøgsleder, lic.agro. Erik Jørgensen takkes for udførelse af de statistiske analyser. Under-

søgelsen er udført med økonomisk støtte fra KS-Fonden, Danske Slagterier.

Litteratur

- Almlid, T. 1981. Does enhanced antigenicity of semen increase the litter size in pigs? *Z. Tierzuchtg. Züchtgsbiol.* 98, 1-10.
- Beer, A. E. & Billingham, R. E. 1976. *The immunobiology of mammalian reproduction.* Prentice Hall Inc., Englewood Cliffs, New York. pp 240.
- Blichfeldt, T. 1984. Effect of addition of antigen, adjuvant or mitogen to semen on embryonic survival in artificially inseminated gilts. *Z. Tierzuchtg. Züchtgsbiol.* 101, 298-304.
- Cheng, S. P., Hsia, L. C. & Ji, L. W. 1985. The effect of intrauterine infusion of gilts with saline or semen before insemination on reproductive performance. *J. Chinese Soc. Anim. Sci.* 1-2, 63-66.
- Erices, J., König, M. und Schulz, J. 1990. Zur Sensibilisierung der Gebärmutter bei Jungsaunen vor ihrer Zuchtbenutzung mit Seminalplasma oder abgetötetem Sperma von Ebern (Kurzmitteilung). *Mh. Vet.-Med.* 45, 762-763.
- Gooneratne, A. D. & Thacker, P. A. 1989. Effect of intrauterine infusion of sperm antigens on gilt fertility. *Theriogenology.* 6, 1221-1226.
- Han, K. Y., Kim, C. K., Yoon, J. T., Kim, H. T., Chung, V. C., Seo, K. D., Youn, Y. W. & Lee, Y. M. 1988. A study on increase of litter size by intrauterine infusion on semen antigens before breeding in gilts. *Korean J. Anim. Sci.* 30, 532-541.
- Kjeldsen, N. 1988. Personlig meddelelse.
- Meding, J.H. 1983. Befrugningseffektiviteten af ornesæd tilsat hvide blodlegemer (leukocyter) som antigen. *Medd. nr. 497, Statens Husdyrbrugsforsøg.*
- Murray, F. A., Grifo, A. P. Jr. & Parker, G. F. 1983. Increased litter size in gilts by intrauterine infusion of seminal and sperm antigens before breeding. *J. Anim. Sci.* 56, 895-900.
- Murray, F. A. & Grifo, A. P. 1986. Intrauterine infusion of killed semen to increase litter size in gilts. *J. Anim. Sci.* 62, 187-190.
- Skjervold, H., Almlid, T., Onstad, O. & Fossum, K. 1979. Evidence of immunological influence on the number of live embryos in pigs. *Z. Tierzuchtg. Züchtgsbiol.* 96, 235-236.
- Vorting, M. 1987. Betydningen af immunreaktioner i uterus for soens reproduktion. *Licentiatforhandling, Den kgl. Veterinær- og Landbohøjskole, København pp. 50.*

