



12. JULI

NR. 497

Befrugtningseffektiviteten af ornesæd tilsat hvide blodlegemer (leukocyter) som antigen

J. H. Meding

Afd. for forsøg med svin og heste

Forsøgsornestation Hatting

Børge Laursen

K/S Samsøfarmen

Der er foretaget en sammenligning af befrugtningseffektiviteten af ornesæd med og uden tilsætning af dybfrosne leukocyter som antigen, med henblik på forbedring af frugtbarheden. I denne undersøgelse har tilsætning af leukocyter til sæden ikke resulteret i nogen signifikant forbedring i hverken drægtighedsprocent eller kuldstørrelse.

Indledning

Immunologiske mekanismer i reproduktionsprocesserne har i de senere år påkaldt sig betydelig interesse, (Almlid og Rein, 1980). I 1979 meddelte Skjervold et al. (1979) de foreløbige resultater ved inseminering med ornesæd tilsat leukocyter som antigen. Undersøgelsen viste, (Almlid, 1981) at hos gylte, som insemineredes med sæd indeholdende $100-200 \times 10^6$ leukocyter, fandtes 12 procent flere normale embryoner 28-35 dage efter konceptionen end hos kontrolgruppen uden leukocyter.

På grundlag af disse resultater blev iværksat en undersøgelse, som skulle forsøge at reproducere

de af Skjervold et al. (1979) opnåede resultater, men hvor der i stedet for friske leukocyter blev anvendt leukocyter, som havde været nedfrosset og opbevaret i flydende kvælstof.

Materiale og metoder

Som bloddonorer blev anvendt fire landrace-orner. Blodet opsamledes fra V. jugularis i evakuerede flasker. Som antikoagulans blev anvendt natriumcitrat. Det opsamlede blod, 250-600 ml fra hver orne, blev indsendt til Slagteriernes Forskningsinstitut, Roskilde, hvor den videre behandling med henblik på separation og frysning foregik på følgende måde: Blodet centrifugeredes

2100 × g ved 4°C, hvorefter laget, der indeholdt leukocyter, afsugedes. De medfølgende erythrocyter lyseredes i 0,83% NH₄Cl. Denne lysering foretoges i to omgange. Leukocyternes centrifugeredes herefter ved 200 × g og opslemmedes i Eagles Minimal Essential Medium (MRM) med 5% Newborn Calf Serum (NCS). Cellerne centrifugeredes atter ved 200 × g, resuspenderedes i NCS og tilsattes samme mængde MRM med 20% dimethylsulfoxid (DMSO). Herefter blev leukocyterne fra de fire donor-orner efter sammenblanding påfyldt ampuller à 100 × 10⁶ leukocyter, nedfrosset ved -80°C og overført til flydende kvælstof.

Optøning af leukocyterne fandt sted dagen før inseminering ved anbringelse af ampullerne i et vandbad ved 37°C indtil begyndende smeltning. Herefter overførtes indholdet af en ampul (100 × 10⁶ leukocyter) i 10 ml 20°C varm Hanks opløsning (brugsopløsning) hvortil der var tilsat 20% Newborn Calf Serum (NCS). De således opslemmede leukocyter afsendtes sammen med sæden til modtagerbesætningen. Umiddelbart før insemineringen overførtes ca. 100 × 10⁶ leukocyter til plastflasker indeholdende ca. 60 ml EDTA-fortyndingsvæske til færdigfortynding af sæden. Endeligt insemineringsrumfang var 90 ml indeholdende 2,2–2,5 × 10⁹ levende sædceller.

Forsøget blev udført som split sample i én besætning. Den ene halvdel af hundyr insemineredes med leukocytholdig sæd, den anden halvdel uden tilsætning af leukocyter til sæden. Der insemineredes to gange i brunsten med 18–24 timers mellemrum.

Resultater

Der blev insemineret ialt 146 hundyr hvoraf de 127 var LY-krydsninger og de resterende 19 enten L- eller Y-søer.

I tabel 1 er vist de opnåede resultater med og uden tilsætning af leukocyter til sæden. Med 76 l. insemineringer tilsat leukocyter er opnået en drægtighedsprocent på 86,8 og en gennemsnitlig kuldstørrelse ialt på 11,5 grise. Tilsvarende opnåedes med 70 l. insemineringer uden leukocyter en drægtighedsprocent på 82,9 og en gennemsnitlig kuldstørrelse på 11,6. Forskellen i drægtigheds-

procent på 3,9 procentenheder til fordel for leukocyttilsætning er ikke signifikant.

Tabel 1. Befrugtnings effektivitet med ornesæd tilsat leukocyter som antigen

Fortyndingsvæske	ant. l. ins.	% drægtige	gens. kuldstr. ialt
+ leukocyter	76 (66)	86,8	11,5
- leukocyter	70 (61)	82,9	11,6
forskel		3,8	-0,1

Tallene i parentes angiver antallet af krydsningssøer.

Diskussion

I denne undersøgelse har tilsætning af leukocyter til sæden ikke kunnet forbedre kuldstørrelsen ved faring. Om der har været en forøgelse af antallet af normale embryoner 28–35 dage efter konceptionen sammenlignet med kontrolgruppen, således som fundet af Almlid (1981), kan ikke afgøres, men forekommer lidet sandsynligt. En signifikant forbedring af drægtighedsprocenten efter leukocyttilsætning er heller ikke fremkommet, hvilket heller ikke var tilfældet i Almlids (1981) undersøgelse. De i undersøgelsen anvendte leukocyter har været konserveret ved nedfrysning i flydende kvælstof. En sådan frysning beskadiger ikke leukocyternes antigene egenskaber (Kissmeyer, 1981, personlig meddelelse), hvorfor den manglende effekt af leukocyttilsætningen ikke kan tilskrives denne frysekonservering.

Det har i denne undersøgelse ikke været muligt at reproducere de af Skjervold et al. (1979) opnåede resultater, og selvom en forbedring af frugtbarheden ved leukocyttilsætning fortsat mangler dokumentation, kan en forbedring af frugtbarheden ved tilsætning af andre antigener til sæden ikke udelukkes.

Litteratur

Almlid, T. & K. A. Rein: Immunologiske forhold i forbindelse med reproduksjonen. Norsk Veterinærtidsskrift 1980, 92,2, 85–91.

Almlid, T.: Does enhanced antigenicity of semen increase the litter size in pigs? *Z. Tierzüchtg. Züchtgsbiol.* 1981, 98. 1-10.

Skjervold, H., T. Almlid, O. Onstad & K. Fossum: Evidence of immunological influence on the number of live embryos in pigs. *ibid.* 1979, 96, 235-236.

