

INTRA-UTERIENE INSEMINATIE BIJ MENS EN DIER

S. Verberckmoes, A. Van Soom, M. Thys, A. de Kruif

Vakgroep Voortplanting, Verloskunde en Bedrijfsdiergeneeskunde, Faculteit Diergeneeskunde, Universiteit Gent,
Salisburylaan 133, B-9820 Merelbeke
Ann.Vansoom@UGent.be

SAMENVATTING

Kunstmatige inseminatie (KI) of de introductie van sperma in de vrouwelijke geslachtstractus door middel van instrumenten is een techniek die zowel bij de mens als bij onze huisdieren routinematig toegepast wordt. Terwijl bij de mens de techniek meestal gebruikt wordt ter bestrijding van infertiliteit, liggen bij de productiedieren economische motieven aan de basis. Dit heeft als gevolg dat de indicaties voor de techniek totaal verschillen bij mens en dier. Bij de mens is de minder goede spermakwaliteit bij koppels die een fertiliteitsbehandeling volgen, vaak een reden om tot KI over te gaan, terwijl in de rundveefokkerij stieren met slecht sperma niet ingezet kunnen worden. Toch wordt het toepassen van KI bij rundvee recent ook beïnvloed door het feit dat minder fertiel sperma op de markt is gekomen. Het gaat hier met name om gesekest sperma, waarmee het mogelijk is nakomelingen van één bepaald, gewenst geslacht te verwekken. Dit plaatst de huidige KI-techniek in een totaal ander daglicht.

In dit overzicht wordt de historiek van KI bij mens en dier geschetst en wordt toegelicht in hoeverre de indicaties voor KI bij mens en dier verschillen. Ook wordt getracht een beter beeld te krijgen van de invloed van de spermakwaliteit op KI-resultaten en van welke manipulaties van het sperma, zoals het invriezen of seksen van sperma, deze resultaten negatief kunnen beïnvloeden. Tenslotte wordt ook nog het bestaan van een spermareservoir bij de verschillende diersoorten besproken, en de rol die het speelt bij sperma-overleving *in vivo*.

INLEIDING

Kunstmatige inseminatie (KI) of de introductie van sperma in de vrouwelijke geslachtstractus door middel van instrumenten was de eerste voortplantingstechniek die over de hele wereld toegepast werd bij onze grote huisdieren. Met "eerste" wordt zowel het moment in de geschiedenis bedoeld als de belangrijkste techniek wat aantallen betreft (Chupin en Thibier, 1995). De eerste melding van KI bij dieren werd gemaakt door de Arabieren en dateert van ongeveer 1322 na Christus. Van Arabische hengsten werd sperma afgenomen en gebruikt voor het bevruchten van merries, terwijl in die tijd nog onbekend was hoe de bevruchting precies plaatsvond. De eerste stap in de andrologie werd gezet door de Nederlander Van Leeuwenhoek (Foote, 2002), die in 1678 een microscoop ontwikkelde om sperma te kunnen observeren. Hij kon als eerste sperma zichtbaar maken en noemde het "animalcules" of spermadiertjes. Ruim honderd jaar later ontdekte de Italiaan Spallanzani (1784) dat een teef drachtig gemaakt kon worden met de cellulaire fractie van een ejaculaat. Hij toonde ook aan dat

afkoelen en invriezen het sperma kon "stilleggen", terwijl het weer kon "opgewekt" worden door opwarming. Rond 1900 kreeg professor Ivanoff van het Russisch vorstenhuis de opdracht om KI bij paarden tot ontwikkeling te brengen. Tegen 1922 had hij methoden gevonden om sperma af te nemen en te insemineren bij zowel paarden, rundvee, schapen als varkens (Ivanoff, 1922). Zaad van hengsten werd gecollecteerd door een spons in de vagina van een merrie te brengen vóór de natuurlijke dekking. Deze spons werd vervolgens gebruikt om een andere merrie mee te insemineren. Veel van Ivanoffs werk werd overgenomen door Milovanov (1938), die de eerste kunstvagina's ontwikkelde. Heden ten dage worden nog kunstvagina's gebruikt die perfect gelijken op de eerste prototypen. De eerste commerciële KI-vereniging werd opgestart in 1936 door de Deen Sørensen (Foote, 2002). In het begin werd KI bij het rund uitgevoerd met vers sperma, maar sinds 1965 wordt voornamelijk diepvriessperma gebruikt. In de eenentwintigste eeuw wordt KI bij alle productiedieren toegepast: rundvee, paarden, schapen, geiten, var-

kens, kippen, kalkoenen, konijnen, bijen, ... Maar ook bij de gezelschapsdieren wint KI aan belang.

De grootste vooruitgang op het gebied van spermatechnologie is geboekt bij rundvee (Vishwanath, 2003). Tijdens de laatste decennia is ook het gebruik van KI in de varkensvleesproductie sterk toegenomen, van ongeveer 5% van alle dekkingen in 1980 tot 60 à 70% in 2000 (Singleton, 2001; Vyt *et al.*, 2004). Toch wordt diepvriessperma bij het varken nog relatief weinig gebruikt in tegenstelling tot de situatie bij het rund (Singleton, 2001; Vyt *et al.*, 2004).

Oorspronkelijk werd KI bij rundvee toegepast wegens sanitaire redenen. Later werd het economisch voordeel dat kon verkregen worden door de versnelde genetische vooruitgang, het belangrijkste motief om aan KI te doen (Foote *et al.*, 1956; Watson, 1990). Indien de inseminatiedosis verminderd zou kunnen worden zonder achteruitgang van de vruchtbaarheid, dan zouden het aantal inseminaties en het aantal nakomelingen van zeer waardevolle vaderdieren kunnen toenemen. Dit zou niet alleen voordeel bieden voor de KI-centra maar ook voor de veehouders.

Bij de mens wordt KI al meer dan 200 jaar toegepast bij de behandeling van onvruchtbare echtparen. De eerste gedocumenteerde toepassing van KI dateert van rond 1770 in Londen en werd uitgevoerd door John Hunter (Siegler, 1944). Een patiënt met ernstige hypospadië kreeg het advies om het sperma dat tijdens de coïtus vrijkwam op te vangen in een verwarmde spuit en dit vervolgens in de vagina van zijn echtgenote te injecteren. In 1873 rapporteerde Dr. Sims zijn bevindingen in verband met 55 inseminaties. Intra-uteriene inseminatie (IUI) werd bij de mens pas algemeen toegepast in de zestiger jaren van de vorige eeuw. In het begin werd hiervoor versperma gebruikt, wat in sommige gevallen leidde tot ernstige neveneffecten, zoals de introductie van infecties of van pijnlijke baarmoedercontracties die uitgelokt werden door de in het zaadplasma aanwezige prostaglandines (Rowell en Braude, 2003). Deze problemen werden opgelost door vóór de inseminatie het zaadplasma te verwijderen (Martinez *et al.*, 1993). Een alternatief voor IUI is In Vitro Fertilisatie (IVF) met of zonder Intra Cytoplasmatische Sperma Injectie (ICSI), gevolgd door embryotransplantatie (Oehninger, 2001). De introductie van ICSI betekende een grote sprong voorwaarts in de geassisteerde voortplanting bij de mens (Palermo *et al.*, 1992, 1996; Van Steirteghem *et al.*, 1993). ICSI opende nieuwe perspectieven bij de behandeling van extreme subfertiliteit bij de man en maakte het mogelijk

om epididymaal of testiculair sperma (Silber *et al.*, 1995) en zelfs spermatozoa zonder acrosoom (Lundin *et al.*, 1994) te gebruiken. Nu wordt IVF met of zonder ICSI vaak gebruikt bij ernstige vormen van infertiliteit bij de mens (Oehninger, 2001).

Wanneer kunstmatige inseminatie uitgevoerd wordt bij dieren en mensen, wordt de cervixbarrière gepasseerd om het aantal spermacellen te verhogen op de plaats van de fertilisatie (Allen *et al.*, 1985). Dit vormt een gemeenschappelijk gegeven bij de KI zoals die wordt toegepast bij mens en dier. Toch zijn er behoudens dit passeren van de cervix weinig overeenkomsten tussen KI bij de mens en KI bij het dier. Niet alleen anatomische verschillen interfereren met de toepassing van de techniek, maar voornamelijk de opvallende verschillen in spermakwaliteit tussen mensen en dieren geven aanleiding tot totaal andere indicaties voor KI. In dit overzicht zullen we ons vooral toespitsen op de verschillen tussen mens en dier wat de indicaties, de spermakwaliteit en het resultaat van IUI betreft.

INDICATIES VOOR KI BIJ DIEREN EN MENSEN

Bij dieren werd KI voornamelijk wegens sanitaire redenen ingevoerd. Vóór het introduceren van KI werden koeien op verschillende boerderijen gedekt door dezelfde stier, wat vaak resulteerde in het verspreiden van venerische ziekten en de daarbij horende vruchtbaarheidsproblemen. Bij rundvee worden de meeste fertiliteitsproblemen die verband houden met natuurlijke dekking veroorzaakt door *Campylobacter fetus* subspecies *venerealis* (vibriosis) en *Tritrichomonas foetus*, terwijl *Taylorella equigenitalis* het belangrijkste infectieuze agens is dat subfertiliteit bij merries veroorzaakt (Hoffer, 1981; Timoney, 1996; de Kruif, 2003). Ook de controle en de preventie van niet-seksueel overdraagbare aandoeningen, zoals tuberculose, brucellose en paratuberculose, konden verbeteren na introductie van KI (Thibier en Guerin, 2000).

Andere grote voordelen van KI bij vee waren de snelle verspreiding van waardevolle genen en de mogelijkheid om de genetische kwaliteit te verbeteren en het aantal letale genen te verminderen (Foote *et al.*, 1956; Watson, 1990). De introductie van KI bij varkens, pluimvee en konijnen resulteerde in een snelle verbetering van de karkaskwaliteit en liet de expansie en specialisatie van fokkeenheden toe (Singleton, 2001). Op deze manier werd de toepassing van KI een geschikte en rendabele technologie in de intensieve

veehouderij. Bij pluimvee wordt KI bijna uitsluitend gebruikt bij kalkoenen voor commerciële vleesproductie (Donoghue en Wishart, 2000). De reden hiervoor is het contrast in lichaamsgewicht en -grootte tussen de hanen (grote witte kalkoenen kunnen meer dan 33 kg wegen) en de hennen (ongeveer 9 kg bij het begin van de leg), waardoor de natuurlijke dekking belemmerd wordt. Ook is de extreme selectie op groei gerelateerd aan een verminderde fertiliteit, waardoor de integratie van KI in de commerciële pluimvee-productie onvermijdelijk wordt (Reddy, 1995; Donoghue en Wishart, 2000). Toch kent de toepassing van KI bij dieren ook nadelen. Het beperkt aantal genetisch waardevolle dieren (meestal van dezelfde familie) dat op grote schaal gebruikt wordt, is waarschijnlijk het belangrijkste nadeel. Dit vergroot immers het risico op inteelt en bijkomende genetische defecten.

De introductie van glycerol als cryoprotectans voor sperma en verbeteringen in het invriesprotocol maakten het mogelijk om rundvee te insemineren met diepvriessperma. Daardoor trad er een snelle verspreiding van waardevolle genen op en kwamen internationale fokprogramma's tot ontwikkeling. Dit was het meest succesvol in de melkveehouderij (Chupin en Schuh, 1993; Chupin en Thibier, 1995). Vooraleer een melkveestier kan ingezet worden, moet hij aan verschillende selectiecriteria voldoen. Eerst wordt hij gebruikt als proefstier. Tijdens deze periode wordt sperma verzameld, geëvalueerd en ingevroren. Enkele honderden koeien worden met dit sperma geïnsemineerd om te bepalen 1) hoe de fertiliteit van de stier is en 2) wat de productie- en conformatiekarakteristieken van de stierendochters zijn. Na drie tot vier jaar worden alle gegevens (onder andere deze op het gebied van de melkproductie) van de nakomelingen van de proefstier geanalyseerd. Op dat moment wordt beslist of de stier al dan niet op grote schaal kan ingezet worden voor inseminatiedoel-einden. De toepassing van zulke fokprogramma's vermindert het aantal stieren dat gebruikt wordt, maar doet het aantal nakomelingen van zeer waardevolle stieren toenemen. Toch is het invriezen van sperma niet bij alle dieren even succesvol als bij rundvee. Sperma van paarden, schapen, varkens, geiten, pluimvee en konijnen is veel gevoeliger voor invriezen. Bij deze diersoorten zijn de resultaten na inseminatie met diepvriessperma veel slechter dan met vers sperma, tenzij speciale inseminatietechnieken gebruikt worden (Mocé *et al.*, 2003; Armstrong en Evans, 1984; Salamon en Maxwell, 2000;

Donoghue en Wishart, 2000; Johnson *et al.*, 2000; Leboeuf *et al.*, 2000; Linfor en Meyers, 2002).

Bij de mens werd KI oorspronkelijk uitgevoerd bij fysiologische en psychologische disfuncties, zoals retrograde ejaculatie, impotentie door hypospadie en vaginisme. Later werd KI gebruikt voor de behandeling van mannelijke infertiliteit door immunologische oorzaken of door niet-corrigeerbare spermadeficiënties, voor een gewenste zwangerschap bij vrouwen zonder partner of lesbische vrouwen, of als een alternatieve bron van sperma tijdens cycli van geassisteerde voortplanting wanneer het orgineel spermastaal niet beschikbaar was (Bronson *et al.*, 1984; Barratt *et al.*, 1992; Wolf *et al.*, 2001). Nu zijn mannelijke subfertiliteit en onverklaarbare infertiliteit de meest voorkomende indicaties voor KI bij de mens (Ombelet *et al.*, 1995). Volgens de literatuur kan KI de kans op conceptie bij idiopathische en mannelijke subfertiliteit significant verhogen (Cohlen *et al.*, 2000). Twee belangrijke studies in Nederland en in het Verenigd Koninkrijk (Goverde *et al.*, 2000; Philips *et al.*, 2000) toonden aan dat drie cycli van IUI dezelfde cumulatieve zwangerschapspercentages gaven als IVF, terwijl het met minder kosten gepaard ging.

Het is duidelijk dat de indicaties voor IUI bij de mens en bij vee totaal verschillend zijn. IUI wordt bij de mens dus uitgevoerd in die gevallen waar de vruchtbaarheid een probleem vormt, terwijl KI bij dieren uit economische overwegingen wordt toegepast. Daarenboven resulteerden de hogere natuurlijke fertiliteit van rundvee en de strenge selectiecriteria van de fokprogramma's bij dieren in een populatie van fokstieren met een veel betere spermakwaliteit dan die van de gemiddelde man.

SPERMAKWALITEIT BIJ DIEREN EN MENSEN

Vee dat geselecteerd wordt voor de productie van vlees of melk, wordt gehouden uit commerciële en niet uit emotionele overwegingen. Bij deze dieren (rundvee, varkens, pluimvee, konijnen, schapen en geiten) werd een strenge selectie op het gebied van de vruchtbaarheid uitgevoerd, wat aanleiding heeft gegeven tot fokdieren met een goede spermakwaliteit. Bij dieren die als gezelschapsdier gehouden worden, zoals honden en paarden, werd de selectie op vruchtbaarheid niet zo strikt uitgevoerd als bij de productiedieren, wat geleid heeft tot een veel grotere variatie in spermakwaliteit bij deze diersoorten.

Zowel bij mens als dier wordt dezelfde basistechniek gebruikt om sperma te beoordelen: evaluatie van het volume, de concentratie, het percentage membraanintacte spermatozoa, de spermamorfolgie en het percentage van totaal en progressief beweeglijke spermatozoa. Het uiteindelijk doel van de sperma-beoordeling is het inschatten van het bevruchtend vermogen. Bij rundvee werden reeds verschillende studies uitgevoerd om een eenvoudige en betrouwbare test te vinden om de in vivo fertiliteit te voorspellen (Larsson en Rodriguez-Martinez, 2000). Ondanks het feit dat een aantal studies toegespitst was op één enkel spermakenmerk, zoals morfologie (Barth, 1993), motiliteit (Stalhammar *et al.*, 1994; Holt *et al.*, 1997) en de aanwezigheid van intacte acrosomen (Cumming, 1995), is geen enkele van deze kenmerken op significante wijze gecorreleerd met de in vivo fertiliteit. Wel kan een combinatie van verschillende spermakenmerken de betrouwbaarheid verhogen waardoor de fertiliteit van een bepaald spermastaal voorspeld kan worden (Zhang *et al.*, 1999; Amann en Hammerstedt, 1993; Farrell *et al.*, 1998; Rodriguez-Martinez, 2003). Ook kan onder bepaalde omstandigheden een positieve correlatie gevonden worden tussen het aantal spermacellen dat bindt aan 0,1 mm² oviductepitheel en de in vivo fertiliteit van stieren (De Pauw *et al.*, 2002). Omdat deze spermaoviduct bindingsassay nog nieuw is en slechts in een goed uitgerust laboratorium kan uitgevoerd worden, wordt ze nog niet veel gebruikt. Tot op heden is het bepalen van de progressieve motiliteit van een spermastaal de belangrijkste factor om de in vivo fertiliteit van een bepaald dier te voorspellen. Het is echter wel zo dat alleen stieren met een normale tot uitstekende fertiliteit gebruikt worden voor KI: de zeer goede spermakwaliteit bij al deze dieren maakt het zeer moeilijk zonet onmogelijk om de kleine verschillen in fertiliteit die tussen de dieren onderling bestaan, te voorspellen gebaseerd op één enkel spermakenmerk.

Bij andere diersoorten, zoals bij honden en paarden, is er echter veel meer variatie in spermakwaliteit en in vivo fertiliteit dan bij rundvee (Loomis, 2001). Bij paarden is een conventionele "breeding soundness examination" voldoende om hengsten te identificeren die niet voldoende vruchtbaar zijn. Dit wil echter niet zeggen dat er met deze hengsten niet meer gefokt zal worden (Colenbrander *et al.*, 2003), want als de hengst populair is of een goed sportpaard is, zal hij nog altijd ter dekking gesteld worden. Ook hondenfokkers selecteren niet echt op vruchtbaarheid en

bijgevolg kunnen populaire reuen met sperma van slechte kwaliteit zonder enig voorbehoud ingezet worden in de fokkerij. Toch is de gemiddelde spermakwaliteit bij de reu zeer hoog in tegenstelling tot de situatie bij het paard (Sieger, 1986; Thomassen *et al.*, 2001).

De aanpak van spermaonderzoek bij de mens is vergelijkbaar met die bij dieren en kent dezelfde beperkingen. Met uitzondering van sperma dat bedoeld is voor donorinseminatie wordt er in de humane voortplanting geen rekening gehouden met de vruchtbaarheid van het sperma, aangezien ook mannen met minder goed sperma het recht hebben op hun eigen biologische kinderen. Sperma van donors wordt enkel gebruikt als het van goede kwaliteit is en vrij is van infectieuze ziekten (American Fertility Society, 1990). Vergeleken met sperma van dieren varieert de spermakwaliteit van de mens echter zeer sterk en in het algemeen is de vruchtbaarheid van de man ook veel lager (Tabel 1). De enorme variatie van de humane spermakwaliteit vergemakkelijkt de voorspelling van de vruchtbaarheid door middel van spermakenmerken. De toepassing van strikte morfologische criteria (Tygerberg strict criteria) is zeer waardevol gebleken in het voorspellen van de uitkomst van IVF (Van Waart *et al.*, 2001) en IUI (Coetzee *et al.*, 1998). Om bevredigende zwangerschapsresultaten te krijgen na IUI, moet minstens 5% van de spermatozoa morfologisch normaal zijn (Ombelet *et al.*, 1997; Montanaro-Gauci *et al.*, 2001; Van Waart *et al.*, 2001). Wanneer de normale spermamorfolgie hoger ligt dan 14% wordt de kans op zwangerschap na IUI 1,8 keer groter dan wanneer ze lager ligt dan 14% (Montanaro Gauci *et al.*, 2001). Naast de morfologie zijn andere parameters, voornamelijk de motiliteit en het aantal geïnsemineerde beweeglijke spermatozoa, bruikbaar gebleken bij het voorspellen van het succes van IUI. Wanneer de motiliteit hoger is dan 50%, wordt de kans op succes na IUI 3 keer groter dan wanneer de motiliteit lager is dan 50% (Montanaro Gauci *et al.*, 2001).

HET EFFECT VAN INVRIEZEN EN SEKSEN VAN SPERMA OP VRUCHTBAARHEID

Vóór 1950 werden de meeste inseminaties bij koeien verricht met vers sperma. Dit sperma blijft echter maar enkele dagen van voldoende kwaliteit, wat een belangrijke beperking betekent voor het gebruiksgemak en voor de verdeling van het sperma naar verafgelegen locaties (Vishwanath en Shannon, 2000).

Tabel 1. Criteria gebruikt voor vers sperma van mannen (spermadonors) en stieren (IUI).

	Man	Stier
Volume	= 2 ml	= 2 ml
Concentratie	= 50×10^6 /ml	= 600×10^6 /ml
Totale motiliteit	= 50%	= 80%
Progressieve motiliteit	= 25%	= 65% (= 35% na ontdooien)
Normale morfologie	= 8%	= 80%
Totaal sperma	= 40×10^6	= $1,2 \times 10^9$
Witte bloedcellen	= 1×10^6	ND

ND = not determined

Bij de mens worden dezelfde criteria gebruikt voor spermadonors en voor fertiliteitspatiënten met een uitzondering voor de spermaconcentratie: = 20×10^6 /ml. Data aangepast van WHO manual 1999 en de Kruif (persoonlijke mededeling).

Er zijn reeds allerlei verdunners ontwikkeld om sperma gekoeld te kunnen bewaren, maar tot op heden is geen enkele verdunner geschikt gebleken om het sperma langer dan een dag of drie te bewaren zonder dat er een daling van de drachtigheidsresultaten optreedt (Foote, 1978). De ontwikkeling van een verdunner waarbij sperma 4 tot 5 dagen goed blijft, zou de problemen van de distributie kunnen oplossen en zou het aantal inseminatiedoses dat van één ejaculaat geproduceerd kan worden, opdrijven (De Pauw *et al.*, 2000).

In tegenstelling tot vers sperma kan diepvriessperma theoretisch oneindig lang opgeslagen worden. Het invries- en ontdooiproces heeft echter een onomkeerbaar negatief effect op het sperma; zowel de beweeglijkheid en de morfologie als de daaropvolgende drachtigheidsresultaten gaan achteruit (Holt, 2000). Rundersperma is van alle species het minst gevoelig voor vriesschade, maar zelfs met de beste bewaarstechnieken overleeft slechts maximaal 50% van de spermacellen het invries- en ontdooiproces (Vishwanath en Shannon, 2000). Bij rundvee kunnen ongeveer dezelfde drachtigheidsresultaten verkregen worden met ingevroren als met vers sperma (55% per cyclus), maar de inseminatiedoses liggen bij diepvriessperma wel 10 maal hoger dan bij vers sperma (Shannon, 1978; Foote en Parks, 1993). Naast het gemak van de verdeling is een groot voordeel van diepvriessperma dat de stier in kwestie op infectieuze

ziekten gescreend kan worden vóór het sperma wordt gebruikt. Momenteel wordt meer dan 95% van al het rundersperma ingevroren (Chupin en Thibier, 1995). Het gebruik van vers verdund sperma is voornamelijk beperkt tot Nieuw-Zeeland. Het wordt in geringe mate ook toegepast in Afrika, Frankrijk, Australië, Duitsland en Oost-Europa (Thibier en Wagner, 2000). Om het aantal inseminatiedoses dat per fokstier geproduceerd kan worden te maximaliseren, werden verdunningen gemaakt om tot een optimaal aantal spermacellen per dosis te komen. Zo kan een onderscheid gemaakt worden tussen stieren met hoge, gemiddelde en lage vruchtbaarheid, afhankelijk van het aantal spermacellen dat per inseminatiedosis nodig is om acceptabele drachtigheidsresultaten te verkrijgen (respectievelijk 5 , 10 of 15×10^6 spermatozoa) (Den Daas *et al.*, 1998). Met een gemiddelde productie van 5 tot 6×10^9 spermatozoa per ejaculaat en een optimale frequentie van 6 afnames per week, kan een productie van 30 tot 40×10^9 spermatozoa per week bereikt worden. Met een afnameschema van 50 weken per jaar en 10×10^6 spermatozoa per inseminatiedosis, kunnen er per stier per jaar 200 000 spermadoses voor KI verkregen worden (Vishwanath, 2003). Omdat sperma van andere diersoorten veel gevoeliger is voor vries- en ontdooischade, is het gebruik van diepvriessperma bij andere diersoorten veel minder belangrijk en ge-

Tabel 2. Drachtigheidsresultaten verkregen met "gesekst" diepvriessperma gedeponeerd of in het corpus uteri of halverwege de uterushoornen bij vaarzen.

Behandeling/plaats	Aantal spermacellen	Aantal vaarzen	Aantal drachtig d 60-63
Gesekst/ corpus	1,5 x 10 ⁶	27	9 (33%) ^a
Gesekst/corpus	3,0 x 10 ⁶	25	9 (36%) ^a
Gesekst/ hoornen	1,5 x 10 ⁶	24	7 (29%) ^a
Gesekst/ hoornen	3,0 x 10 ⁶	24	8 (33%) ^a
Controle/ corpus	20 x 10 ⁶	24	17 (71%) ^b

^{a,b}Waarden met een verschillend superscript binnen dezelfde kolom zijn significant verschillend ($p < 0,05$) (Naar Seidel *et al.*, 1999).

beurt dit met een veel lager economisch rendement dan bij rundvee.

Het is duidelijk dat de situatie bij de mens totaal anders is. De spermakwaliteit is over het algemeen veel minder goed en om een zwangerschap te bewerkstelligen wordt het volledige ejaculaat altijd gebruikt (Tabel 1). Bij het insemineren wordt vers sperma gebruikt, behalve wanneer er sprake is van donorsperma. Vanwege de slechte spermakwaliteit wordt zowel vers als ingevroren mannensperma eerst gewassen en behandeld voordat het intra-uterien geïnsemineerd wordt om de fertilisatiepercentages te verbeteren (Aitken en Clarkson, 1987). Door de wasprocedure worden prostaglandines, infectieuze agentia, antigenische proteïnen, niet-beweeglijke spermatozoa, leukocyten en immature kiemcellen verwijderd. Om het aantal beweeglijke spermatozoa te verhogen, kan glaswolfiltratie gebruikt worden of een densiteitsgradiënt, zoals in een "swim-up", in een Puresperm[®] centrifugatie (NidaCon International AB, Gothenburg, Sweden) of Percoll[®] centrifugatie (Pharmacia, Uppsala, Sweden) (Erel *et al.*, 2000; Sakkas *et al.*, 2000; Tomlinson *et al.*, 2001a,b). Bij de twee laatste technieken worden cellulaire debris, niet-beweeglijke spermatozoa en abnormale spermatozoa gevangen in de tussenfase, terwijl normale spermatozoa met goede beweeglijkheid in de punt van de proefbuis verzameld worden. Bij een "swim-up" of opzwemtechniek worden motiele spermatozoa verzameld aan het oppervlak van het medium in de proefbuis. Het gemiddelde zwangerschapspercentage is na IUI met 1 miljoen geselecteerde normaal motiele spermatozoa ongeveer 13% per cyclus (Om-

belet, 2003). Dit is veel lager dan de 55% drachtigheid per cyclus die bij rundvee verkregen wordt na IUI met hetzij 10 miljoen niet-geselecteerde ingevroren spermatozoa of met 2 miljoen verse spermatozoa (Foote en Parks, 1993).

Recent is er bij het rund echter een situatie ontstaan die vergelijkbaar is met die bij de mens. Dit is te wijten aan één van de belangrijkste technologische vorderingen op het gebied van de spermabewerking, namelijk het "seksen" van sperma door DNA kwantificatie door middel van flowcytometrie. De mogelijkheid om X- en Y-dragende spermacellen te scheiden, betekent een belangrijke stap voorwaarts in de veehouderij (Seidel, 2003). Doordat er per uur echter maar een beperkt aantal spermacellen kan gesorteerd worden, is het momenteel nog te vroeg voor een economische toepassing op grote schaal. Daarbij komt nog dat het lage aantal spermatozoa per inseminatiedosis en de lagere kwaliteit van het "gesekste" sperma resulteren in slechte drachtigheidspercentages. De gegevens die momenteel beschikbaar zijn over drachtigheidsresultaten verkregen met gesekst sperma betreffen enkel die van vaarzen onder experimentele condities. Deze waren significant lager dan die van niet-gesekst sperma (Tabel 2) (Seidel *et al.*, 1999). Ook werd er wat dit betreft geen verschil gevonden tussen het insemineren van gesekst sperma in het corpus uteri en ter hoogte van de uterushoornen (Seidel *et al.*, 1999). Aangezien de uterus van oudere koeien veel groter is dan die van vaarzen, mag verwacht worden dat de resultaten bij koeien nog slechter zullen zijn. Mogelijk kan bij koeien inseminatie dichtbij de eileider een voordeel opleveren. Momen-

teel wordt dienaangaande door onze vakgroep een veldstudie uitgevoerd.

SPERMAVERDELING EN BEVOLKING VAN HET SPERMARESERVOIR

Wanneer koeien, schapen, geiten en honden gedekt worden, wordt het sperma gedeponereerd ter hoogte van het ostium uteri externum. Vooraleer eicellen bevrucht kunnen worden in de ampulla van het oviduct, moeten de spermatozoa de cervixbarrière en het baarmoederlichaam passeren om het functioneel spermareservoir te bevolken dat zich bevindt in de isthmus van het oviduct (Suarez, 1999). Tijdens het transport van de spermatozoa naar de eileider neemt het aantal spermacellen enorm af (Hunter en Greve, 1998). Een groot deel gaat verloren door retrograde terugvloeien in de cervicale mucus (Larsson en Larsson, 1985; Mitchell *et al.*, 1985; Nelson *et al.*, 1987) en door fagocytosis tijdens de migratie door de uterus (Hawk, 1983). Eens de spermacellen de uterotubale junctie gepasseerd zijn, komen ze in de isthmus van het oviduct, waar een functioneel spermareservoir gevormd wordt (Hunter en Wilmut, 1982, 1984; Yanagimachi, 1994; Suarez, 1999). In deze spermavriendelijke omgeving blijven de spermatozoa gebonden aan het oviductepteel tot aan het moment van ovulatie (Suarez *et al.*, 1990). Daarna maakt een aantal spermatozoa zich los en beweegt zich naar de ampulla alwaar de eicel zich bevindt (Hunter en Wilmut, 1984).

Andere vormen van een spermareservoir zijn aanwezig bij pluimvee en bijen en worden respectievelijk "fossulae spermaticae" en "spermateka" genoemd. De fossulae spermaticae worden aangetroffen in het distale deel van het oviduct bij alle vogelsoorten die tot op heden bestudeerd werden. Vanuit deze fossulae komen de spermacellen geleidelijk vrij zodat er constant een voldoende grote spermipopulatie aanwezig is op de plaats van de fertilisatie (Bakst, 1993). In tegenstelling tot het spermareservoir bij onze huisdieren, waarbij het sperma maar enkele uren tot dagen goed blijft, kunnen spermatozoa bij vogels veel langer opgeslagen worden. Kalkoenhennen bijvoorbeeld, kunnen bevruchte eieren produceren tot 16 weken na inseminatie, indien ze geïnsemineerd werden vóór de start van de eileg (Christensen en Bagley, 1989). De spermateka bij bijen heeft een functie die vergelijkbaar is met de fossulae spermaticae bij pluimvee. Spermatozoa kunnen in dit reservoir zonder probleem zelfs gedurende 3 tot 4 jaar opgeslagen blijven

(Pechhacker, 2003). Het is duidelijk dat door de aanwezigheid van dit specifieke spermareservoir het moment van inseminatie bij pluimvee en bijen van ondergeschikt belang is.

Bij onze grote huisdieren is echter bekend dat het moment van inseminatie wel erg belangrijk is en dit is ook zo bij de mens. In het algemeen is het ideale tijdstip van inseminatie bij rundvee 12 uur na het begin van de oestrus (Hunter en Greve, 1997). Maar omdat bronstdetectie niet altijd even eenvoudig is, kan het moeilijk zijn om het juiste tijdstip van inseminatie te bepalen (Van Eerdenburg *et al.*, 1996). Bij de mens wordt IUI meestal uitgevoerd na een gecontroleerde hyperstimulatie van de eierstokken. In dat geval kan het moment van ovulatie tamelijk precies worden vastgesteld. Het exacte tijdstip van ovulatie kan bij de vrouw zowel door middel van echografie als door middel van hormoonanalyses, onder andere luteïniserend hormoon (LH), oestradiol (E2) en progesteron (P) vastgesteld worden (Check *et al.*, 1994; Filicori *et al.*, 2003).

Wanneer een normale inseminatie bij het rund wordt uitgevoerd, wordt het sperma in het baarmoederlichaam gedeponereerd. Door het simpele feit dat het sperma de hindernis van de cervix, die de grootste barrière vormt voor het spermatransport na een natuurlijke dekking, niet hoeft te passeren, kan de inseminatiedosis 500-maal gereduceerd worden zonder een vermindering van de fertiliteit (Senger, 1993). Conventionele inseminatie bij rundvee wordt onder rectale controle met een stalen Cassou-inseminatiepipet uitgevoerd. Deze stalen pipet wordt bedekt met een plastic hoes om schade aan de genitaaltractus te vermijden. Bij paarden en varkens wordt het sperma ook bij een natuurlijke dekking in de uterus gedeponereerd. De inseminatiedosis kan bij deze diersoorten dan ook niet zo sterk worden gereduceerd als bij het rund. Bij schapen, geiten en honden is het passeren van de cervix zeer moeilijk. Bij deze diersoorten worden de beste resultaten verkregen na laparoscopie (Hill *et al.*, 1998; Verberckmoes *et al.*, 2001). Een alternatief voor IUI bij deze species is intravaginale inseminatie. Hiervoor is echter 10 maal meer sperma nodig dan bij IUI (Tsutsui *et al.*, 1988; Lindforsberg *et al.*, 1999). Bij intravaginale inseminatie met diepvriessperma bij deze species zijn de drachtigheidsresultaten ook zeer slecht (Armstrong en Evans, 1984; Salamon en Maxwell, 2000; Thomassen *et al.*, 2001).

In de vijftiger jaren van de vorige eeuw werd heel wat onderzoek bij runderen uitgevoerd met de bedoeling de resultaten van een diepe inseminatie in de

baarmoederhoornen te vergelijken met die van een normale inseminatie (in het baarmoederlichaam) (Knight *et al.*, 1951; Salisbury en VanDemark, 1951; Stewart en Melrose, 1952; Olds *et al.*, 1953). In de meeste studies werd er geen verschil gevonden tussen beide inseminatietechnieken. In deze studies werd de diepe intra-uteriene inseminatie uitgevoerd door sperma met een onbuigzame pipet in de baarmoederhoorn te brengen. Slechts enkele experimenten werden uitgevoerd met een flexibele pipet waarbij het sperma tot vlakbij de uterotubale junctie kon worden afgezet (Hawk *et al.*, 1988). Theoretisch kan de spermadosis, die 15×10^6 spermatozoa bedraagt bij een normale inseminatie, minstens 100-maal gereduceerd worden als het sperma gedeponereerd wordt bij de uterotubale junctie (Hunter, 2001). Dit zou voornamelijk veroorzaakt worden doordat er minder verlies optreedt van spermacellen (Hunter, 2001). Tijdens de jaren negentig kwam er opnieuw interesse voor diepe inseminatietechnieken omdat het mogelijk werd sperma te "seksten" (Johnson, 1991; Cran *et al.*, 1993). Die interesse werd aangewakkerd door het feit dat er bij varkens en paarden geen dracht tot stand kwam wanneer er op de klassieke wijze geïnsemineerd werd met gesekst sperma, maar wel als er UTJ-inseminatie werd gebruikt (Morris en Allen, 2002; Rath, 2003a). Bij paarden kan reeds graviditeit bekomen worden met 3 miljoen spermacellen als deze op het ostium uterinum (uterotubale papilla) gedeponereerd worden (Morris *et al.*, 2000). Zo'n inseminatie wordt uitgevoerd met een hysteroscoop (Lindsey *et al.*, 2002). Bij het varken werden speciale flexibele inseminatie-pipetten ontworpen om UTJ-inseminatie uit te voeren (Martinez *et al.*, 2001; Grossfeld *et al.*, 2003). De anatomie van de genitaaltractus van de zeug maakt het gebruik van rigide pipetten immers onmogelijk. In studies van Rath *et al.* (2003b) en Grossfeld *et al.* (2003) werden er biggen geproduceerd na UTJ-inseminatie van zeugen met 50×10^6 gesekste spermatozoa. Dit is slechts 2,5% van de conventionele inseminatiedosis die bij niet-gesekst sperma gebruikt wordt. Ook bij het rund wordt diepe inseminatie aangeraden wanneer lage spermadoses (< 5 miljoen ingevroren spermatozoa) gebruikt worden of bij minder vruchtbaar sperma. Toch kan tot op heden geen positief effect van dergelijke diepe inseminaties aangetoond worden (Seidel *et al.*, 1999). Het feit dat in deze studie alleen vaarzen gebruikt werden, kan een verklaring zijn voor het ontbreken van dit effect.

Een opmerkelijk anatomisch verschil tussen huisdieren en mensen is dat bij de vrouw de uterus relatief groter is en er geen baarmoederhoornen aanwezig zijn. Bij de mens kunnen inseminaties intravaginaal, intracervicaal, pericervicaal met een kapje, intra-uterien, intratubaal of direct intraperitoneaal uitgevoerd worden. Meestal wordt er echter intra-uterien geïnsemineerd (Oei *et al.*, 1992; Ripps *et al.*, 1994; Ombelet *et al.*, 1995; Guzick *et al.*, 1999). IUI is een eenvoudige, goedkope en weinig invasieve techniek waarbij het inseminaat traag geïnjecteerd wordt tot hoog in de uterusholte (Peterson *et al.*, 1994). Inseminatie vlakbij de UTJ wordt bij de mens niet gedaan, alhoewel een aantal klinische studies uitgevoerd werd waarbij het sperma direct in het oviduct (Fallopian Sperm Perfusion, FSP) werd gedeponereerd. FSP zou eventueel toegepast kunnen worden bij patiënten met onverklaarbare infertiliteit, maar in de meeste andere gevallen zijn de resultaten van FSP vergelijkbaar met die van IUI (Karande *et al.*, 1995; Nuojua-Huttunen *et al.*, 1997; Trout en Kemmann, 1999).

In tegenstelling tot de situatie bij onze huisdieren is de UTJ bij de mens meer trechtervormig en niet bekleed met mucosaplooien (Hafez en Black, 1969; Beck en Boots, 1974). De UTJ vormt bij de dieren dus een barrière, terwijl dit bij de mens niet het geval is. Daarbij komt nog dat er bij de vrouw geen spermareservoir in het oviduct blijkt te bestaan, zoals dat bij de meeste huisdieren wel is aangetoond (Williams *et al.*, 1993).

CONCLUSIE

IUI is een eenvoudige en succesvolle techniek bij zowel mens als dier. Terwijl IUI bij de mens vooral geïndiceerd is bij de behandeling van subfertiliteit die veroorzaakt wordt door een slechte spermakwaliteit, wordt IUI bij de huisdieren toegepast wegens sanitaire redenen en uit economische overwegingen. Gesekst sperma heeft een minder goede kwaliteit. Daarom is inseminatie ter hoogte van de UTJ interessant. Deze techniek is bij de merrie en de zeug al van groot nut gebleken. Wat het effect is van diepe inseminatie bij het rund, moet echter nog verder onderzocht worden.

REFERENTIES

De volledige literatuurlijst kan opgevraagd worden bij de auteurs.