

DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

MAKKOSNÉ PETZ BRIGITTA

**NYUGAT-MAGYARORSZÁGI EGYETEM
MEZŐGAZDASÁG- ÉS ÉLELMISZERTUDOMÁNYI KAR
MOSONMAGYARÓVÁR**

2007

**NYUGAT-MAGYARORSZÁGI EGYETEM
MEZŐGAZDASÁG- ÉS ÉLELMISZERTUDOMÁNYI KAR
ÁLLATTUDOMÁNYI INTÉZET**

Programvezető:

KOVÁCSNÉ dr. habil GAÁL KATALIN
a mgtud. kandidátusa

Témavezető:

dr. habil BALI PAPP ÁGNES
PhD.

**MÉLYHÚTÓTT SPERMA TERMÉKENYÍTŐ-
KÉPESSÉGÉNEK BECSLÉSE IN VITRO KÖRÜLMÉNYEK
KÖZÖTT**

Készítette:

MAKKOSNÉ PETZ BRIGITTA

MOSONMAGYARÓVÁR

2007

MÉLYHÚTÓTT SPERMA TERMÉKENYÍTŐ- KÉPESSÉGÉNEK BECSLÉSE IN VITRO KÖRÜLMÉNYEK KÖZÖTT

Írta:

Makkosné Petz Brigitta

Készült a Nyugat-Magyarországi Egyetem Mezőgazdaság- és Élelmiszertudományi Kar
Állattudományi Intézet
Mosonmagyaróvár

Az állati termék-előállítás biológiai, technológiai és ökonómiai kérdései

Doktori iskola

Az állati termék termelés nemesítési és tartástechnológiai vonatkozásai

programja keretében

Témavezető: Dr habil. Bali Papp Ágnes

Elfogadásra javaslom (igen/nem) (alíírás)

A jelölt a doktori szigorlaton%-ot ért el

Mosonmagyaróvár,.....

a Szigorlati Bizottság elnöke

Az értekezést bírálóként elfogadásra javaslom (igen/nem)

Első bíráló (Dr.) igen/nem

(alíírás)

Második bíráló (Dr.) igen/nem

(alíírás)

A jelölt az értekezés nyilvános vitáján%-ot ért el.

Mosonmagyaróvár,

.....

a Bírálóbizottság elnöke

A doktori (PhD) oklevél minősítése

.....

Az EDT elnöke

TARTALOMJEGYZÉK

BEVEZETÉS.....	5
AZ ÉRTEKEZÉS CÉLKITŰZÉSEI	7
IRODALMI ÁTTEKINTÉS.....	8
I. A sertés termékenyítő anyag tárolásának történeti áttekintése.....	8
1. A fagyasztási eljárások fejlődése.....	8
2. A fagyasztás folyamán használt hígítók	10
3. A fagyasztás előtt alkalmazott spermakezelési eljárások.....	11
4. A felolvasztás alatt alkalmazott spermakezelési eljárások.....	16
II. Az in vitro fertilizáció (IVF)	19
1. Az IVF céljai:	20
2. Az IVF technológiája.....	21
III. Termékenyítő anyag vizsgálati módszerek:	28
1. Fénymikroszkóppal értékelhető festési eljárások.....	28
2. Fluoreszcens festési eljárások.....	29
3. A funkcionális membránintegritás értékelése hipoozmotikus teszt (HOST) segítségével	30
4. Áramlási sejtanalízis.....	30
ANYAG ÉS MÓDSZER.....	31
1. A vizsgálatok helyszíne és ideje.....	31
2. A laboratóriumok műszerezettsége	31
3. A spermakezelésekhez használt adalék-anyagok	32
4. Spermavizsgálati módszerek	32
5. A spermavétel.....	32
6. Statisztikai analízis	32
EREDMÉNYEK ÉS MEGBESZÉLÉS.....	32
1. A spermavizsgálati módszer kiválasztása és a rövid idejű tárolás hatása a termékenyítő anyagra.....	32
2. A fagyasztás előtti ekvilibrációs idő meghosszabbításának hatása a kanspermiumok membránintegritására.....	32
3. Fagyasztás és felolvasztás utáni spermakezelés (rövid idejű centrifugálás, swim-up és percollos kezelés)	32
ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK.....	32
KÖVETKEZTETÉSEK, JAVASLATOK	32
ÖSSZEFOGLALÁS	32
SUMMARY	32
IRODALOMJEGYZÉK.....	32
KÖSZÖNETNYÍLVÁNÍTÁS	32

BEVEZETÉS

A biológiai sokféleség megőrzése az emberi környezet, az emberiség fennmaradásának egyik előfeltétele. Az őshonos magyar állatfajták - a magyar szürke, a racka juh, a mangalica, de az őshonos kutyafajták, mint a pumi, a mudí, a komondor, a magyar vizsla - fennmaradása, értékének megőrzése veszélyben van. A XXI. század elején globális problémát jelent a túlnépesedés, a fejlődő országok népeinek élelmiszerellátása. Óriási szerepet kap a mezőgazdaság azáltal, hogy mind a növénytermesztésben, mind az állattenyésztésben a legjobb minőségű árut termelje meg a lehető legnagyobb mennyiségben a lehető legkevesebb idő alatt. Többek között ezen igények kielégítésére a sertésenyésztők fáradalmas munkájának eredménye, hogy a legértékesebb genetikai állománnyal rendelkező sertés kanokat és kocákat tenyésztették ki. Az így létrehozott értékes kanokat egy-egy nem kívánt betegség elpusztíthatja, vagy az idő előrehaladtával az állat fedezésképtelenné válhat, illetve spermájának minősége törvényszerűen romlik. Ezekben az esetekben a megteremtett tenyészérték nem örökíthető tovább. A biológiai sokféleség fenntartása, megőrzése nem megoldhatatlan; a megoldást a még élő, értékes kanok spermájának mélyhűtése és a génbank létrehozása, és a már meglévő génbankok fenntartása jelentené.

További előnyök is származnak az örökítőanyag mélyhűtéséből. Korlátlan ideig tárolható, bármikor és bárhol felhasználható. Nincs szükség a fedező kan és a termékenyítésre váró koca közvetlen találkozására, érintkezésére, nem kerül át a kanról nemi betegséget okozó mikroba a kocára. A genetikailag értékes kanokat mesterséges termékenyítésbe vonják, rendszeresen leveszik a termékenyítő anyagukat, ezáltal sokkal nagyobb mennyiségű örökítő anyag nyerhető értékes tenyészéveik alatt, mint természetes körülmények között. Egyetlen ejakulátumából több koca is fedezésbe vonható attól függetlenül,

hogyan melyik termékenyítő állományon van. Potenciálisan több utód születhet egy-egy értékes kantól.

A világ számos laboratóriumában végeztek és végeznek kutatómunkát ma is a különféle haszonállatok termékenyítő anyaga hosszútávú tárolásának megoldására. Legeredményesebbnek a fagyasztva történő tárolás bizonyult, annak ellenére, hogy a fagyasztás és a felolvasztás felére csökkenti a spermiumok motilitását (Tuli és mtsai 1992). A túlélő mozgékony spermiumok mozgása más, kevésbé aktív, mint a friss ejakulátum spermiumaié (Verheyen és mtsai 1993). A legtöbb mesterséges termékenyítést folyékony állapotú hígított spermával végzik ugyanazon a napon, melyen levették a termékenyítő anyagot, vagy 1-5 napos 15-20°C-on történő tárolást követően (Johnson és mtsai 2000). Fagyasztott sertés sperma 1975 óta szerezhető be mind pellet, mind szalmában tárolt formában (Johnson és mtsai 2000).

Ismert, hogy a fagyasztott sperma alacsonyabb termékenyítő képességű, mint a friss ejakulátum (Almid és Hofmo 1996, Johnson 1998), ezért a jelenleg használatos fagyasztási eljárásoknak tökéletesnek kellene lenniük, de korán sincs ez így. Az egyik oka, hogy a sertés spermiumok különös érzékenységet mutatnak a hideg sokkal és a fagyasztással szemben a bika spermához képest (Polge 1956). Amióta felfedezték, hogy a hideg sokkal szembeni ellenállás megnövelhető a fagyasztás előtti pihentetési idő meghosszabbításával (Pursel és mtsai 1972), a legtöbb sertés sperma mélyhűtési eljárás néhány órás 15 °C-on vagy ez alatti hőmérsékleten történő pihentetést foglal magában. A legjobb minőségű fagyasztott-felolvasztott sperma eléréséhez szükséges optimális pihentetési idő azonban nem ismert.

AZ ÉRTEKEZÉS CÉLKITŰZÉSEI

A nem mélyhűtött spermával történő inszeminálással elérhető vemhesülési, és leginkább alomszámbeli eredmények javítása érdekében három kísérletsorozatot hajtottunk végre.

Az első kísérletsorozat célja, hogy 17°C-on végzett hét napos tárolási kísérlet során *in vitro* körülmények között naponta megbecsüljük az élő/elhalt spermiumok számát, nyomon kövessük a spermiumok mozgásképességében bekövetkezett változásokat, valamint az akroszóma-változásokat a két festési módszer párhuzamos alkalmazásával, összehasonlítva a minták szubjektív motilitás vizsgálataival, majd a további kísérletekben alkalmazott spermavizsgálati módszer kiválasztásra kerüljön.

A második vizsgálat-sorozatban meghatároztuk a hosszú távú tárolásra használt fagyasztás előtti kezelések egyes lépéseit, és ezek hatásait a fagyasztott újraolvasztott sertés termékenyítő anyagra. Majd ennek ismeretében a fagyasztás előtti ekvilibrációs idő meghosszabításának hatását vizsgáltuk a kanspermiumok életképességére és membránintegritására. Célunk volt, hogy az esetleges szezonális különbségekre is fényt derítsünk, ezért a kísérletet nyáron és ősszel is elvégeztük.

A harmadik ütemben a fertilizáció hatékonyságának javítása érdekében további kansperma előkezeléseket alkalmaztunk. Ennek érdekében megvizsgáltuk a rövid idejű centrifugálás, a felúsztatás (swim up) és a Percoll-os kezelés hatását fagyasztott felolvasztott sertés termékenyítő anyagra.

IRODALMI ÁTTEKINTÉS

I. A sertés termékenyítő anyag tárolásának történeti áttekintése

1. A fagyasztási eljárások fejlődése

A spermiumok életképességének hosszabb távú megőrzését már a legelső kísérletekben is hűtéssel érték el. Spallanzani (1776) harminc percen át tárolt hóban emberi, csődör és bika spermát azzal a céllal, hogy anyagcseréjük csökkentése révén életüket meghosszabbítsa. A sejtek inaktívvá váltak, majd felengedés után a spermiumok újból életképesnek mutatkoztak. Fagyasztással elsőként Mantegazza (1866) foglalkozott; -17°C -ra hűtött le emberi spermiumokat, a felolvasztást követően a sejtek visszanyerték motilitásukat, életképesnek mutatkoztak. Az ő kísérletének leírása volt az első beszámoló arról, hogy emlős sejtek túléltek a fagyasztás és felolvasztás procedúráját.

A mai napig használt különféle fagyasztási alaptechnikák döntő lépései lényegében megegyeznek. Eltérések elsősorban az ekvilibrációs idő hosszában, az egyes fázisok sorrendjében, a spermium-koncentráció beállításában illetve a hígításban és a fagyasztás ütemében és a csomagolás szisztémájában adódnak. Mindegyik technika alkalmazza a centrifugálás előtti szemínális plazmában való ekvilibrációt, a centrifugálást, a koncentrált formában történő sperma fagyasztását és az alacsony koncentrációjú glicerol hozzáadását.

A glicerol tartósító hatásának felismerése új korszakot nyitott a termékenyítőanyagok tárolásának fejlődésében (Polge és mtsai 1949): felhasználásával különféle sejteket, szöveteket, közöttük különféle gazdasági állatok gamétáit hűtötték le. Elkezdődtek azok a kutatások, amelyek a sertés sperma fagyasztásával foglalkoztak. (Polge 1956, Hoffmann 1959, Hess és

mtsai 1960, Dukelow és Graham 1962, Bader 1964, Iida és Adachi 1966, King és MacPherson 1966, Kojima és mtsai 1967, Rohlhoff 1967, Bamba és mtsai 1968). Ezekben a kísérletekben a fagyasztott és újra felolvasztott spermiumokat vizsgálták, majd temékenyítési kísérleteket végeztek, bár sorra rossz eredménnyel. (Settergen 1958, King és MacPherson 1967, Dalrymple és MacPherson 1969). A technikák fejlődésével napjainkban más állatfajok termékenyítő anyagához hasonlóan sertés spermiumok mélyhűtése is megvalósítható. (Bali Papp 2004)

A hatvanas években elvégzett kísérletek megalapozták a további kutatómunkát. A hetvenes évek elejére olyan sertés spermium mélyhűtési eljárásokkal dolgoztak, melyek során a spermiumok jobban megőrizhették termékenyítő képességüket. (Crabo és Einarsson 1971, Graham és mtsai 1971a,b, Pursel és Johnson 1971a) Az eljárásokat gyakran módosították, és egymás után számoltak be a sikerekről (Crabo és mtsai 1972a, Richter és Liedicke 1972, Salamon és Visser 1972, Vincente 1972, Wilmut és Polge 1972). Einarsson 1973-ban ismertette az első fagyasztási eljárásokat, és azok gyakorlati alkalmazásainak lehetőségeit. Az egyes procedúrák elsősorban a hígítók összetételében és a spermakezelési eljárásokban különböztek. Az egymástól távoli és függetlenül működő laboratóriumokban különféle fagyasztó hígítókkal dolgoztak, más-más fagyasztás előtti spermakezelési eljárást alkalmaztak illetve a felolvasztó hígítók is különfélék voltak, és a felolvasztási technikák sem voltak egységesek. Az egyes fagyasztási eljárásokhoz egyedi hígítókat fejlesztettek ki, és ezeket más technológiákban nem lehetett alkalmazni (Osinovo és Salamon 1976).

2. A fagyasztás folyamán használt hígítók

A fagyasztás során alkalmazott hígítóknak két nagy csoportja ismert. Az egyikbe a **puffer nélküli** hígítók tartoznak, mint a tojássárgája-glükóz (Baier 1962, Polge és mtsai 1970), tojássárgája-laktóz (Richter és mtsai 1975, Westendorf és mtsai 1975), tojássárgája-szacharóz-EDTA, Mg és Ca sókkal (Milovanov és mtsai 1974). Használatos puffer nélküli hígítóadalék az Orvus Es Paste (Westendorf és mtsai 1975). Nátrium és tri-ethanolamin lauryl szulfát tartalma miatt a spermiumok felolvasztás után nagy arányban megőrzik motilitásukat, akroszómaszerkezetük épségét és a termékenyítő képességüket (Pursel és mtsai 1978). Mindehhez a tojássárgája jelenléte is nélkülözhetetlen. Az Orvus Es Paste emulgeálhatja és diszpergálhatja a tojássárgája lipidjeit, megnövelve a felület/tömeg arányt, ezáltal fokozza a hígító és a spermium membránjának fizikai és/vagy kémiai interakcióit (Pontbriand és mtsai 1989).

A másik csoportot a **puffertartalmú** hígítók alkotják, mint a glicerín-foszfát és glükóz-foszfát (Iida és Adachi 1966), tojássárgája-glükóz-citrát (Serdiuk 1970), tojássárgája-glükóz-citrát-EDTA-kálium unitol-urea (Shapiev és mtsai 1976), Beltsville F3 (BF3) (Pursel és Johnson 1971a), Beltsville F5 (BF5) (Pursel és Johnson 1975), Tes-tris-fruktóz-citrát-tojássárgája (TEST) (Graham és mtsai 1971a), Tes-nátrium, kálium-glükóz-tojássárgája (Crabo és Einarsson 1971, Larsson és mtsai 1977), Tris-fruktóz-EDTA-tojássárgája (Salamon és Visser 1973), Tris-glükóz-EDTA-tojássárgája (Park és mtsai 1977).

A legtöbb hígító izotóniás vagy hipertóniás a szeminális plazmához képest. A hozzáadott cukor mennyiségével szabályozzák az ozmotikus viszonyokat. Az ozmotikus nyomást és a pH értékét úgy állítják be, hogy a lehető legnagyobb mértékben közelítse meg a szeminális plazmában mérhető normálértékeket (Einarsson 1971). A nem pufferolt oldatban a tojássárgája biztosítja a pufferkapacitást. Általános összetevők a cukrok, proteinek vagy lipoproteidek,

pufferok, protektáns vegyületek - fagyasztás alatt bekövetkező káros hatások elleni - leginkább glicerol - és egyéb adalékanyagok. Néhány esetben szemínális plazmát is magába foglal a végső médium (Salamon és Visser 1973).

Számos kutatócsoport saját hígítót fejlesztett ki a sertés sperma mélyhűtéses tárolására (Polge és mtsai 1970, Graham és mtsai 1971b, Crabo és Einarsson 1971, Salamon és Visser 1973, Pursel és Johnson 1971a, 1975, Westendorf és mtsai 1975, Larsson és Einarsson 1976a, Paquignon és Courot 1976). Az egyes hígítók összetétele nagyon különbözött és kevés kísérlet vizsgálta a különféle komponensek pontos szerepét (Salamon és mtsai 1973, Visser és Salamon 1974, Wilmut és Polge 1977a,b), így a különböző pufferokat tartalmazó hígítók közül csak egynéhány volt használható az újabb termékenyítési eljárásokban.

Sarhaddi és mtsai szedimentálással próbálták az ivararányt módosítani, ők az itt alkalmazott hígítók hatásait vizsgálták (1995).

3. A fagyasztás előtt alkalmazott spermakezelési eljárások

Már évekkel ezelőtt felismerték, hogy az akroszóma sérülések szintén a hígítás és tárolás következményei, és valószínű, hogy a glicerol jelenlétének tulajdonítható (Wilmut és Polge 1977a,b). Ezért a felolvasztás utáni legjobb motilitás és akroszóma integritás elérése érdekében Fiser és Fairfull (1990) maximum 3%-os gliceroltartalmat és 30°C/perces fagyasztási ütemet ír elő. A 2 és 4% közötti glicerolkoncentrációt mások is javasolják (Almid és mtsai 1988, Almid és mtsai 1989, Buhr és mtsai 2001)

Hernandez és mtsai (2007) kísérleteiben a fagyasztás üteme nem befolyásolta szignifikánsan a fagyasztás és felolvasztás után mért sperma minőségét. Ők a fagyasztó hígító 3%-os glicerol koncentrációját, és 1800°C-os melegítési

ütemet javasoltak ahhoz, hogy a spermiumok megőrizhesség életképességüket és épségüket. A kapott eredmények más kutatócsoportok vizsgálataihoz hasonlatosak (Almid és mtsai 1988, Almid és mtsai 1989, Buhr és mtsai 2001, Medrano és mtsai 2002). Az **ekvilibráció** megelőzheti a centrifugálást (Pursel és Johnson 1975, Larsson és mtsai 1977). Az ekvilibrációra azért van szükség, mert elősegíti a spermiumok fagyasztás és felolvasztás alatti károsodásokkal szembeni ellenállását. A rezisztencia kialakulása valószínűleg a spermium membránjának a szeminális proteidekkel való interakciójának köszönhető (Pavelko és Crabo 1976). A mozgékony spermiumok aránya az ekvilibrációs idő előrehaladtával fokozatosan nő. Pavelko és Crabo legkevesebb négy és fél órás ekvilibrációs időt ajánlanak ahhoz, hogy kielégítő eredmény szülessen. A mozgékonytság tekintetében a 4%-os gliceroltartalom, az akroszóma épségének tekintetében a 2%-os gliceroltartalom hozott jobb eredményt (Fiser és mtsai 1993). Eriksson és mtsai (2000) a különböző pihentetési időket vizsgálták a felolvasztás utáni sperma néhány paraméterére. A 10-20 órás pihentetést követően a plazma membrán integritása szignifikánsan megnövekedett a három órás pihentetéshez képest. A 20 órás pihentetés szignifikánsan alacsonyabb számú mozgó spermiumot eredményezett, mint azt a 3 vagy a 10 órás pihentetés tette. Szignifikáns csökkenés volt tapasztalható az előrehaladó mozgást végző spermiumok számában, ugyanakkor szignifikánsan több spermium mozgott körkörös/cirkulárisan a hosszabb (10, 20 óra) pihentetést követően. Az átlagos mozgású spermiumok sebessége és az egyenes vonalú mozgású spermiumok sebessége a hosszú pihenő idő után alacsonyabbnak bizonyult a 3 órás pihenőn átesett spermiumokéhoz képest.

A **centrifugálást** vagy a sperma gyűjtésekor (Paquignon és Courot 1976) vagy az inkubációt követően hajtják végre (Pursel és Johnson 1975, Westendorf és mtsai 1975, Larsson és mtsai 1977).

A **fagyasztás** célja, hogy lecsökkentsük vagy akár leállítsuk a spermium anyagcseréjét, úgy, hogy a felolvasztás után az anyagcsere károsodás nélkül ismét beindulhasson. A sertés spermium fej plazma membránjának fluiditását a hőmérséklet változása szignifikánsan befolyásolja (Canvin és Buhr 1989). A spermiumoknak túl kell élniük a fagyasztást, a fagyott állapotban történő tárolást és a felolvasztást. Mindhárom fázis alatt optimális feltételek biztosításával minimálisra csökkenhet a károsodás esélye. Minden tényezőt, körülményt, paramétert úgy kell beállítani, hogy együttes hatásuk eredményeként biztosítani tudják a spermiumok épségét. Az egyik ilyen paraméter a spermium koncentráció. Az alacsonyabb koncentráció ($0,25 \times 10^9$ spermium/ml) emeli a mozgásképes spermiumok számát, míg a magas koncentráció (1×10^9 spermium/ml) csökkenti (Graham és Crabo 1972). Átlagosan a $0,45$ és az 1×10^9 spermium/ml töménység a használatos.

Szignifikáns összefüggés van a fagyasztás során használt glicerol koncentrációja és a fagyasztás üteme között. Az alacsonyabb koncentrációjú **glicerol** hozzáadása gyors lefagyasztást tesz szükségessé (Mazur 1977). Ezt a szükségszerűen gyors fagyasztást kezdetben úgy valósították meg, hogy szárazjégbe vájt lyukakba cseppentették a spermiumokat; a hideg hatására a néhány csepp termékenyítő anyag gömb alakot vett fel - ezt nevezzük pelletnek - amelyet megfelelő tárolóedénybe téve folyékony nitrogénben tároltak (Nagase és Niwa 1963). Sok kutatócsoport ezzel az eljárással dolgozik (Pursel és Johnson 1975, Paquignon és Courrot 1976, Larsson és mtsai 1977, Bali Papp és mtsai 1999).

Mások ampullákban fagyasztották le a sertés spermiumokat viszonylag lassú hűtési ráta mellett, ekkor a glicerol koncentrációja meghaladta az 5 %-ot. Később (Polge 1976) gyorsabban végezték a hűtést alacsonyabb glicerol koncentráció mellett. Westendorf és mtsai (1975) maxi szalmákat használtak a fagyasztás során.

Korábban gömb formában (Wilmot és mtsai 1973, Cöster 1978), vagy maxiszalmában (Westendorf és mtsai 1975, Almid és Johnson 1988) történő fagyasztási eljárások ma már nem használatosak. A jobb eredmények eléréséhez kisebb átmérőjű szalmát kezdtek alkalmazni, ami a fagyasztás és felolvasztás üteméhez jobban tudott alkalmazkodni (Almid és Johnson 1988, Fiser és Fairfull 1990). 2 ml-es lapos szalmát Weitze és munkatársai (1988) valamint Ewert (1988), különféle lapos csomagolást Bwanga és mtsai (1990), Berger és Fischerleitner (1992), Simmet (1993), 5 ml-es műanyag tasakot pedig Rodriguez-Martinez és munkatársai (1996) alkalmaztak először. A 90-es években használatba került 0,5 ml-es szalma előnye, hogy benne a fagyasztás során egységes jégkristályosodási folyamat megy végbe (Weitze és mtsai 1987), relatíve nagyszámú spermium tárolását teszi lehetővé (Saravia és mtsai 2005), jó felolvasztás utáni spermiumtúlélést (Eriksson és mtsai 2001) és AI-t követő termékenyülést (Roca és mtsai 2003) biztosítva. Eriksson és mtsai (2000, 2002) sikerrel alkalmazták az általuk kifejlesztett 5ml-es FlatPack-et számos kansperma fagyasztási és újraolvasztási kísérletben. Saravia és mtsai (2004) különféle csomagolásokban (0,5 ml-es szalma, összetett FlatPack és hagyományos FlatPack) kis térfogaton nagy koncentrációban fagyasztott újraolvasztott sperma minőségét vizsgálták.

Az a hőmérsékleti érték, amelyen a glicerol a hígítóhoz kerül, fontos tényező lehet az eredményesség szempontjából. A standard eljárások 5°C-on írják elő a glicerol hozzáadását (Pursel és Johnson 1975, Pursel és Parks 1985, Almid és Johnson 1988).

A glicerol mennyisége és a felolvasztás közötti összefüggést nem lehet helyesen megbecsülni anélkül, hogy ne vennénk figyelembe a fagyasztás ütemét (Fiser és Fairfull 1990). Ha összehasonlítjuk az optimálisnál alacsonyabb ütemben (1°C/perc) fagyasztott spermiumokat az ugyanazon

ejakulátumból származó, de $30^{\circ}\text{C}/\text{perc}$ gyorsasággal lefagyasztott spermiumokkal a gyorsabb fagyasztás jobb eredményeket mutatott.

4. A felolvasztás alatt alkalmazott spermakezelési eljárások

A **felolvasztási technikák** is folyamatosan módosultak. Különféle előmelegített oldatokban olvasztották fel a pelletet, többek között: szeminális plazmában (Crabo és Einarsson 1971, Crabo és mtsai 1972a, Einarsson és mtsai 1973), lefölözött tejben (Einarsson és mtsai 1972), Hulsenberg hígítóban (Richter és Liedicke 1972, Paquignon és du Mesnil du Buisson 1973) és TES-NaK-glükóz hígítóban (Einarsson és mtsai 1972).

A felolvasztás ütemének hatásossága a hűtési-felolvasztási sebesség arányától függ (Mazur 1985). A hűtésből eredő sérülések elsősorban a hűtés gyorsaságától és a spermiumok végső hűtési hőmérsékletétől függnnek. Ugyanakkor a gyors melegítés rendkívül káros (Watson 1981, Aman és Pickett 1987). Bamba és Cran (1985) kimutatták, hogy a gyors melegítés kevésbé hat a spermiumok motilitására, azonban az akroszomális sérülések nagyobb arányban fordulnak elő. Egyéb sertéssel végzett tanulmányok (Bamba és Cran 1986) megerősítik a gyors melegítés nemkívánatos hatásait. Fiser és mtsai (1993) úgy találták, hogy az 1200°C/perces ütemben történő felolvasztás a legalkalmasabb a 0,5 ml-es szalmában fagyasztott sertés spermiumok esetében. Hernandez és mtsai (2006) egyértelműen kimutatták, hogy a gyors felmelegítés (1800°C/perc) megnöveli a spermiumok túlélési esélyeit. Hernandez és mtsai (2007) jobb DNS aktivitást detektáltak azokban a sertés spermamintákban, amelyeket 1800°C/perc körüli sebességgel olvasztottak fel az 1200°C/perces ütemű felolvasztásokhoz képest. A pellet formában hűtött spermiumokat különböző gyorsasággal és különböző hőmérsékletre olvasztottak és melegítettek fel hígítva, vagy hígítatlanul. A gyorsabb ütem mellett történő felolvasztás kedvezőbbnek bizonyult (Salamon és mtsai 1973), valamint a 37°C-ra való melegítés előnyösebb, mint az ennél alacsonyabb

hőmérsékleten száraz kémcsőben végzett felmelegítés (Larsson és Graham 1973). Az oldatokban történő felolvasztásos kísérletek sokkal eredményesebbek a felolvasztás utáni ép akroszómájú spermiumok arányának tekintetében (Crabo és mtsai 1972b, Pursel és Johnson 1976) és magasabbak a vemhességi mutatók is (Crabo és mtsai 1972b).

Westendorf és mtsai (1975) maxi szalmákban olvasztottak fel spermát különböző hőfokú vízfürdőkben. A legjobb eredményeket a 90°C-os vízfürdőben érték el, amikor a sperma hőmérséklete 20-25°C volt a vízfürdőből való eltávolításkor.

A mikrohullámú sütőben történő felmelegítés során a motilitás és az ép akroszómájú spermiumok előfordulása alacsonyabbnak mutatkozott, mint vízfürdőt használva (Ewert 1988).

A **felolvaszó hígítók** két nagy csoportba oszthatók, ezek egyike protein tartalmú. Ilyen a szeminális plazma (Crabo és Einarsson 1971) és a fölözött tej (Einarsson és mtsai 1972). A másik csoportot a sótartalmú hígítók, mint a Beltsville felolvasztó folyadék (BTS) (Pursel és Johnson 1975), a Hulsenberg hígító (Westendorf és mtsai 1975), az OLEP (Larsson és Einarsson 1976a), az INTRA-ITP (Paquignon és Courot 1976) képviselik. Mindegyikben előfordul cukor komponens (glükóz, laktóz, vagy fruktóz). A spermiumok inkubáció utáni túlélésének biztosításához néhányuk EDTA-t is tartalmaz (Hulsenberg, BTS, INTRA-ITP) (Visser és Salamon 1974, Westendorf és mtsai 1975).

A hígítók közül csak a Hulsenberg hipertónikus, míg a BTS, OLEP és az INTRA-ITP izotónikus. Viszonylag kevés tanulmány vizsgálta az egyes hígítók hatásosságát. Pursel és Johnson összehasonlította a Hulsenberg, a BL1, a szeminális plazmát, a fölözött tejet és a BTS-t. Közülük a BTS biztosította a legtöbb ép akroszómájú és a motilis spermiumot. Igaz más vizsgálatok az INTRA-ITP-t jobbnak találták az inkubáció alatti túlélés, a vemhesülési arány és az embrió túlélés tekintetében (Paquignon és mtsai 1976).

Gadea és munkatársai (2004) a felovasztó hígítóba glutationt - L- γ -glutamil-L-cisztein-glicin – (GSH) keverését javasolják, mert méréseik szerint 32% csökkenés tapasztalható a GSH tartalomban a fagyasztás után a friss termékenyítő anyaggal összehasonlítva. Azt tapasztalták, hogy a GSH felovasztó hígítóba adagolása növelte a kanspermiumok termékenyítő képességét in vitro körülmények között.

Bármely eljárás, melyben a spermiumok testhőmérsékletéről gyors ütemben közel fagypontra hűlnek irreverzibilisen befolyásolja a spermiumok életképességét. A fagyasztás-felolvasztás túlélése szempontjából a spermiumok számára a sejtmembrán állapotának változása döntő jelentőségű. Optimális védelmet kellene biztosítani a plazmamembrán részére a procedúra alatt. A membrán azonban nem egy homogén sejtalkotó, így hasonló kezelésekre a spermiumok különböző részei másképp reagálnak. A kansperma különös érzékenységet mutat a mélyhűtéssel szemben. A sertés spermiumok néhány órás inkubációval ellenállóbbá válnak a hűtés okozta károsodásokkal szemben (Pursel és mtsai 1973). Különböző adalékanyagok a sérülésekkel szemben további védelmet biztosítanak. A tojássárgája, mely a gazdasági állatok termékenyítő anyagát megvédi a hidegsokkal szemben, önmagában nem okoz hasonló fokú védettséget a sertés spermiumoknál (Benson és mtsai 1967), de Orvus ES Paste-vel kombinálva igen. (Pursel és mtsai 1978a, Strzezek és mtsai 1984). A hűtés okozta sérülések bizonyos antioxidánsok, mint a ditret-butyl-kresol (DTBK), az echinochrom (Golyshev 1985) és a butilált hidroxitoluin (BHT) (Graham és Hammerstedt 1992) hatására csökkennek. Alacsony koncentrációjú BHT jelenléte alacsony fokú, percenkénti 5°C hűtési sebesség mellett növeli a spermiumok élethosszát (Bamba és Cran 1992). A mai napig nem sikerült kidolgozni olyan tökéletes fagyasztási eljárást, amely magas színvonalon megőrizné a kansperma

termékenyítő képességét. A motilitással együtt az akroszóma vizsgálata is széles körben használt a fagyasztott felolvasztott kanspermiumok életképességének vizsgálatakor, mivel az akroszóma funkcionális épsége elengedhetetlen a fertilizáció mechanizmusában (Larsson_1985).

II. Az in vitro fertilizáció (IVF)

A folyamat az érett petesejtek laboratóriumi körülmények közötti, kapacitált spermiumokkal történő termékenyítését jelenti. A megfelelően érett petesejteket - MII állapot - a petefészek folliculuszaiból nyerik és érlelik (in vitro maturáció – IVM). Az IVF eredményeként létrejött zigóta optimális feltételek között életképes embrióvá alakulhat fejlődése során (in vitro kultiváció – IVC). A megfelelő stádiumban lévő embriót recipiens állatba ültetik és az értékes génállománnyal rendelkező egyed a vemhesség végén világra jön. Az eljárás hatékonysága végül is a megszületett ivadékokkal mérhető.

Termékenyülést és (in vitro) embriófejlődést több emlős fajnál sikerült elérni (beleértve az embert is). Régebben az eljárás elsősorban a laboratóriumi fajokra (nyúl, egér, patkány, hörcsög és tengerimalac) korlátozódott. Sertés faj esetében Nagai és mtsai (1988), Xu és mtsai (1996), Yoshida (1987) Bali Papp és mtsai (1999, 2005, 2006), Abeydeera (2001), Suzuki és mtsai (2004), T. Somafai és mtsai (2003, 2005) is végeztek kísérleteket, ám az eljárások még nem tökéletesek.

1. Az IVF céljai:

Az in vitro termékenyítés egyik célja a nagy genetikai értékű donorok minél teljesebb kihasználása. A módszer alkalmazása során a petesejtek és a hímivarsejtek kikerülnek természetes környezetükből, és a termékenyítés laboratóriumi körülmények között (in vitro) történik. A sikeresség feltétele, hogy minél tökéletesebben utánozzák az állati szervezetben a termékenyülés előtt végbemenő biológiai folyamatokat. Ehhez különféle médiumokat, adott környezeti feltételeket biztosítanak.

Mód nyílik a termékenyülés tanulmányozására, mert a petevezető ampullájában (in vivo) végbemenő történéseket nehéz követni, de az IVF-fel megkerülhető és tanulmányozható a petevezetőben történő termékenyülés folyamata.

Felhasználható a gaméták vizsgálatában, a meddőségkutatásban, a szaporulat nemének befolyásolásában spermiumok szelektálása által aszerint, hogy melyik ivari kromoszómát hordozzák. Alkalmazásával megoldhatóvá válik az állattenyésztésben a nemesítés, irányított szelekció, sajátos vonalak, egyedek elszaporítása stb.

A hagyományos tenyésztési eljárások mellett jelentős szerep jut napjainkban az exponenciálisan fejlődő biotechnológiai módszereknek is. Egy jól működő in vitro fertilizációs rendszer jól hasznosítható a friss és a mélyhűtött termékenyítő anyag várható értékének becslésére is (Bali Papp és mtsai 1999).

2. Az IVF technológiája

2.1. A petesejtek kinyerése, előkezelése

A petesejt az ovulációkor, vagy közvetlen azután a legalkalmasabb a termékenyítésre. Ekkor a meiózis második metafázisában van, kumulusz sejtekkel körülvéve.

Amennyiben élő donortól származik a petesejt, úgy kinyerésének időpontja determinálható ivarzás szinkronizálással és ovuláció indukció alkalmazásával. A tüsző növekedése ultrahangos eljárással ellenőrizhető. Az érett oocitákat a preovulációs tüszőkből régebben laparotómias, újabban laparoszkopias módszerrel nyerik ki.

Az *in vitro* maturáltatásnak az ivaréres előtti kocasüldők vágóhídi petefészkéből származó COC (cumulus oocyta komplex) a legáltalánosabban felhasznált forrása, bár ezeket a petesejteket még érlelni kell. Ahhoz, hogy a maturáció sikeres legyen elengedhetetlen azon biológiai folyamatoknak az ismerete, amelyek megállítják, majd az ovulációt megelőzően újraindítják a petesejtek meiózisos osztódását. Számos hormon, növekedési faktor, ionok sőt fehérjék befolyásolják ezeket a mechanizmusokat. A külső környezeti feltételek is döntő hatással vannak a folyamatokra, hisz a petesejteket kiragadták eredeti környezetükből. A termékenyítésig ezért szimulálni kell a petevezetőbeli körülményeket: a petevezető-folyadék fiziológiai sótartalmát, pH-értékét (7,6-7,8 között), fehérjeösszetételét és az anyagcsere fenntartásához szükséges szubsztrátokat. Testhőmérséklettel azonos hőmérsékletet és csökkentett oxigéntenziót (5-8%-os) kell biztosítani. A folliculusokból nyert oocitákat fajtól függően általában 24 órán át érlelik (sertés esetében ez 48 óra) magzati borjúsavóval vagy szarvasmarha-szérumalbuminnal és glükózzal (nátrium-piruvát, nátrium-laktát stb.) kiegészített termékenyítéshez

használatos táptalajban (BMOC-3, TCM 199, Ham F10, DM stb.). A spermium könnyebb behatolása érdekében a petesejtet borító rétegeket enzimek tápfolyadékba juttatásával távolítják el: a kumuluszsejteket hialuronidázok hozzáadásával, a zona pellucidát pronázzal oldják fel. (Mattioli és Barboni, 1998)

Az in vitro termékenyítésre alkalmas petesejtek kiválogatását (főként) a kumulusz rétegek elbírálására alapozzák, ami azzal az előnnyel jár, hogy mellőzhető az enzimek használata. (Becze és mtsai 1991)

2.2. A spermiumok kinyerése, előkezelése

A hímivarsejtek az ejakuláció után a női nemi utakba kerülve egy többlépcsős biokémiai és fiziológiai változáson, az úgynevezett kapacitáción (Austin 1951) esnek át, mielőtt az érett petesejtet megtermékenyítenék (Bedford 1983).

Ezt in vitro elsősorban a petesejttel megfelelő ideig együtt inkubálva mosással (hipertónikus oldatban) és/vagy változó időtartamú inkubálással érik el. Kapacitáció során számos strukturális változás megy végbe a spermiumfej membránjának felépítésében, melyeket funkcionális változások sora követ. Fluiditása megnövekszik, módosulnak a membrán ioncsatornái, ennek következtében megnő az intracelluláris Ca^{2+} mennyisége és a pH (Parrish és mtsai 1993), a spermiumok mozgása hiperaktívvá válik (De Mott és Suarez 1992), eközben olyan enzimek szabadulnak fel, amelyek részt vesznek a spermiumok petesejtbe való hatolásában. Ez az **akroszóma reakció** (Yanagimachi 1994). Az említett, a kapacitációt előmozdító kezelések egyúttal az akroszómareakciót is elősegítik, különösen ha a médium petevezetőfolyadékot, szérumalbumint, kumuluszsejteket is tartalmaz. A női nemi utakban található glükóz-aminoglikánok (heparin-szulfát, kondroitin-szulfát), aminosavak (taurin, hipotaurin) és katekolaminok (epinefrin) in vitro

elősegítik a nyúl- és a szarvasmarha spermiumok akroszómareakcióját. A hörcsög, az egér és a nyúl esetében fehérjék (pl. albumin, follikuláris folyadék vagy vérszérum) jelenlétében megy végbe az akroszómareakció, amely ionizált közeg hatására szintén kiváltódik.

Hogy a spermiumok termékenyítőképességét fokozzák újabban eltávolítják vagy megváltoztatják a spermiumokat borító antigénkomponenseket. A zona pellucidától megfosztott hörcsögpetesejtben mért spermiumbehatárolási (termékenyítési) képesség (HEPT-teszt) ugyancsak jobb eredményt mutatott.

2.3. A termékenyítés

A kutatók célja, hogy IVF során az in vivo körülményekhez leginkább hasonlatos in vitro feltételeket teremtsenek.

A petevezetőéhez hasonló csökkentett oxigénkoncentrációt úgy érnek el, hogy a tápfolyadékcséppben levő petesejteket ásványolajjal fedik, és 5%-os CO₂ koncentrációt biztosítanak az inkubátorban. Számos tápfolyadékban lehetséges az emlős oociták termékenyítése. Sokan a laboratóriumban könnyen előállítható izotóniás sóoldatot használják, vagy viszonylag egyszerű összetételű tápfolyadékokat, pl.: SOF, BMOC-3, BMOC-2, Dulbecco-féle PBS. Mások a kereskedelmileg előállított, összetett tápfolyadékokat részesítik előnyben, mint a Ham F 10, MEM, Medium 199. Általában az ionkoncentrációval, az ozmotikus nyomással, a pH változtatásával, valamint különböző energiaforrások (piruvát, laktát, glükóz) hozzáadásával befolyásolják a folyamatot. Meghatározó tényező az érett petesejteket tartalmazó IVF közegbe jutott spermiumok száma is, ami fajonként eltérő ugyan, de a legtöbb in vitro fertilizációs rendszerben relatíve magas spermiumkoncentrációval dolgoznak, mert eredményesebb a termékenyítés. (Nagai 1996). Mások alacsonyabb spermiumkoncentrációt javasolnak, hogy

kevesebb ondósejt juthasson a petesejt közelébe (Barboni és mtsai 1995, Funahashi és Day 1993). Ebben az irányban végzett kutatások megállapították, hogy a különböző fajtájú kanok spermiumainak a petesejt membránján való áthatoló képessége igen különböző (Martinez és mtsai 1993, Wang és mtsai 1995).

Vizsgálták az összefüggést a kumulusz morfológiai változása és a petesejtérés dinamikája között (Somfai és mtsai 2004)

Mivel a spermiumok természetes körülmények közötti szelektálódása in vitro körülmények között elmarad, a petesejt zona pellucidáján való ondósejt penetráció önmagában még nem biztosítja azt, hogy a keletkezett zigóta ivadékká fejlődjön. Emiatt a különböző fajokban elég nagy mértékű (20-40%) embrióelhalás is várható.

2.4. Az IVF során alkalmazott spermakezelési eljárások

A sperma előkezelési eljárások nemcsak az IVF technológia, de a gyakorlati állattenyésztés esetében is igen hasznosak lehetnek. Ezen módszereket először humán vonalon fejlesztették ki, ezek voltak a háziállatoknál alkalmazott spermakezelési eljárások alapjai. A humán IVF kialakulásának fő oka, hogy egyes férfiak spermája termékenyítésre alkalmatlan (pl. az ejakulátum kevés spermiumot tartalmaz, a hímivarsejtek nem motilisak, vagy akroszóma nélküliek).

A háziállatoknál felhasználhatnak friss ejakulátumot, de mélyhűtött ondót is. Mindkét esetben tartalmazhat az ejakulátum nemkívánatos alkotókat, mint például mellékheréből származó dekapacitáló faktorokat, melyek károsak lehetnek a spermiumok termékenyítőképessége szempontjából. Tartalmazhat az ejakulátum fertőző ágenseket, mélyhűtött sperma esetében nem kívánatos a

visszaolvasztás után a krioprotektáns anyagok jelenléte, ezeket el kell távolítani. További negatív hatása a mélyhűtésnek, hogy a mélyhűtött spermiumok jelentős hányada károsodik, illetve termékenyítőképességük csökken. (Watson 2000)

Az IVF szempontjából fontos, hogy a spermiumok tökéletes kapacitáción essenek át. Ennek értelmében a sperma előkezelési eljárások célja a kiindulási anyag (friss ejakulátum vagy mélyhűtött, felolvasztott sperma) megtisztítása a fertőző ágensektől, a dekapacitáló faktoroktól illetve a hígítótól.

Az *in vitro* fertilizációs rendszerekben a termékenyítéshez felhasznált spermiumok koncentrációja fajoként definiált. Ez a meghatározott optimális spermiumszám természetesen élő, motilis és termékenyítőképes spermiumokra vonatkozik. Az IVF rendszerekben tehát alapvető fontosságú az élő és motilis spermium frakció szelektálása a további felhasználás céljából. Az előkezelési eljárások alternatív alkalmazásának szerep jut a gyakorlati állattenyésztésben is, olyan esetekben, ha nagy genetikai értékű, de valamilyen okból csökkent fertilitással rendelkező hímivarú egyedeket szeretnénk tenyésztésbe vonni. Az alacsony fertilitást betegség és a korosodás is okozhatja. Ezen eljárások előnyeit persze nemcsak a kiváló genetikai tulajdonságú tenyészállatok esetén használhatjuk ki, hanem egy-egy ritka fajta vagy faj genetikai anyagának megőrzése céljából.

Számos sperma manipulációs módszert dolgoztak ki már mind humán, mind háziállat IVF-ra. A legismertebbek a különböző mosási eljárások, amelyek során a kiindulási anyagot meghatározott médiumokban, centrifuga segítségével átmoszák. Ez a médium lehet egyszerű kapacitációs médium is. Ismert mosási eljárás a Percoll-grádienseken történő centrifugálás vagy mosás. A Percoll polyvinylpyrrolidon-nal borított szilikon kolloid. Már régóta használják növényi és állati sejtszuszpenziók tisztítására és a sejtek izolálására. Gorus és Pipeleers (1981) közöltek egy módszert a humán sperma

egyrétegű Percoll grádiensen történő szelektálásáról. Később e módszert nyúlspermán is sikeresen használták (Oshio és mtsai 1986).

Ezután a technológia továbbfejlesztésével több eltérő koncentrációjú Percoll grádiensen történő spermaszelektálásról számoltak be. Devries és Colenbrander (1990) sertésnél alkalmazták, Mermillod és munkatársai (1992) pedig szarvasmarhára alkalmazták a többrétegű Percoll-grádiensen történő spermaszeparálást. Ezen kívül más mosási eljárások is használatosak, mint például a Ficoll-os szeparálás és a Sephadex (Valcárcel és mtsai 1996).

IVF rendszerekben a mosási eljárások mellett nagy szerepük van a különféle spermamigrációs eljárásoknak. Ezen eljárások alapelve, hogy a spermát valamilyen anyagba rétegzik, így a motilis spermiumok „önerőből” a másik közegbe vándorolnak. Ezáltal lehetőség nyílik a motilis spermiumok szelekciójára és az egyéb nemkívánatos ágensek – így az elhalt spermasejtek is – külön frakciót képeznek. A legismertebb ilyen migráltatási eljárás a swim-up (vagy felúsztatás). Ezt az eljárást a humán spermára már a 70-es évek elején kifejlesztették (Drevius 1972, Lopata és mtsai 1976) Háziállatokon Parrish és munkatársai (1986) vezették először be a swim-up-ot. A swim-up során egységnyi mennyiségű (általában 1 vagy 2 műszalmányi) spermát helyeznek egy meghatározott kapacitációs médium alá, ezt inkubálják és a motilis spermiumok a felső rétegbe vándorolnak. Rosenkranz és Holzmann (1997) egy transzmigrációs eljárást közölnek, mely során a motilis spermiumoknak mikroperforált membránon történő átjutása teszi lehetővé az élő és motilis sperma-frakció sikeres szelektálását.

A spermakezelési eljárások harmadik csoportját alkotják a spermaszűrési módszerek. Ezek közül az egyik legismertebb az alapanyagként felhasznált sperma üvegyapoton történő átszűrése (Sterzik és mtsai 1998). A szűrés elméleti alapja, hogy az elhalt spermiumok adhézióval az üvegszálak felületéhez tapadnak, míg az élő spermiumok átjutnak az üvegyapoton.

Shamsuddin és Rodriguez-Martinez (1994) egy továbbfejlesztett swim-up-os eljárást közölnek, amely kevésbé károsítja a spermiumokat. A különböző spermakezelési eljárásokat a spermiumokra gyakorolt hatásuk alapján már számos alkalommal összehasonlították. Általában a spermiumok motilitására, membránintegritására és az eljárások in vitro fertilizációs képességre gyakorolt hatását nézik a leggyakrabban.

Korábban már több tanulmány is megjelent a swim-up és Percoll eljárások humán spermiumokra gyakorolt hatásáról, meglehetősen ellentmondásos eredményekkel. Néhány publikációban azt közölték, hogy jobb a Percoll, figyelembe véve a spermiumok integritását, motilitását, morfológiáját és a vemhesülési arányt (Akerlof és mtsai 1987, Menkveld és mtsai 1990, van der Zwalmen és mtsai 1991).

Englert és munkatársai (1992) a swim-up-os kezelést követően kapott alacsonyabb koncentrációjú, de jobb minőségű spermiumokról számoltak be, míg Brandeis és munkatársai (1993) ennek ellentmondó eredményeket közöltek. Számos szerző nem talált különbséget a swim-up-al illetve a Percollal kezelt spermiumok minőségi jellemzői közt (Punjabi és mtsai 1990, Chan és mtsai 1991, Morales és mtsai 1991, Check és mtsai 1992, Sapienza és mtsai 1993).

Szarvasmarha esetében e két módszer összehasonlítása során a Percollal kezelt spermiumok nagyobb koncentrációját és jobb minőségi jellemzőit (életképesség és akroszóma integritás) figyelték meg (Somfai és mtsai 2000). Sertés faj esetében ilyen irányú összehasonlítás ezidáig nem történt meg.

III. Termékenyítő anyag vizsgálati módszerek:

A gyakorlatban végzett termékenyítő anyag vizsgálatoknál csak az ejakulátum motilitását állapítják meg. A különböző festési eljárásokkal fény derül az élő/elhalt sejtek arányára és az akroszóma integritására is, ezáltal képet kaphatunk a sikeres, vagy a kevésbé sikeres jövőbeli termékenyítő képességről.

Számos élő/elhalt sejtek megkülönböztetésére szolgáló festési eljárás ismert. Nagy szemlecikkében (2002) négy kategóriát különít el:

1. Fénymikroszkóppal értékelhető festési eljárások

Ezekben a vizsgálatokban a vitális festék csak az elhalt sejt membránján képes áthatolni, ezáltal jelölni azt, míg a kontrasztfesték a festetlen, azaz élőknek tekintett sejteket fedi fel. Eozin-opálkékét Lasley és mtsai (1942), eozin-analinkékét Shaffer és Almquist (1948), eozin-nigrozint Blom (1950), brómfenolkék-nigrozint Rauhaus (1990) használt először.

Az akroszóma állapota differenciált-interferencia-kontraszt (DIC) mikroszkóp segítségével is értékelhető. Egyéb fénymikroszkóppal értékelhető festési eljárások: eozin B/Fast Green FCF: Wells és Awa 1970; Giemsa: Hancock 1952, idézi Watson 1975; Procion Printing Green B: Chacarov és Mollova 1976; Spermac: Oettlé 1986; Coomassie kék: Larson és Miller 1999.

Talbot és Chacon (1981) kidolgozták a „triple stain” módszerét: tripánkékét, mint vitalitást, bengálvöröset és Bismarck barnát, mint akroszómafestéket egyszerre használva. Kovács és Foote (1992) tripánkékét, neutrálvöröset és Giemst kombinálva egy egyszerűbb festési eljárást hozott létre.

2. Fluoreszcens festési eljárások

Fluoreszcein-diacetát és propidium jodid kombinációjával Mátyus és munkatársai (1984) dolgoztak, Garner és munkatársai (1986) kezdetben a propidium jodid mellett karboxi-fluoreszceint használtak, majd később a karboxi-fluoreszcein helyett SYBR 14 nevű festéket alkalmaztak.

Az akroszóma vizsgálatához fluoreszcens próbákkal konjugált lektinek (*Pisum sativum*, *Arachis hypogea*, *Triticum vulgare*) alkalmasak (Cross és Meizel 1989, Miyazaki és mtsai 1990, Valcárcel és mtsai 1997). Herrera és mtsai (2002) FITC-PSA-t használtak annak kiderítésére, vajon van-e összefüggés az akroszóma reakció és a szubfertilis kan spermiumok előfordulása között.

A kapacitáció állapota klór-tetraciklin (CTC) (Gillan és mtsai 1997), a spermiumfarok középső részében működő mitokondriumok rodamin 123 (Evenson és mtsai 1982), MitoTracker Green FM (Garner és mtsai 1997), JC-1 (5,5',6,6'-tetrakloro-1,1',3,3'-tetraetil-benzimidazolyl-karbocianin-jodid) segítségével értékelhetőek. Huo és mtsai (2002) hígított hosszú időn át tárolt kansperma életképességét, mitokondriális aktivitását, kapacitációt és az akroszóma épségét vizsgálták egyszerre fluoreszcens festéssel. Gadella és Harrison (2002) MITO-t (MitoTrackerTM) használtak annak kimutatására, hogy a bikarbonátnak nincs hatása a kan spermiumok mitokondriumainak működésére. Althouse és Hopkins (1995) sertés sperma életképességét vizsgálták két fluoreszcens festék kombinációjának alkalmazásával.

3. A funkcionális membránintegritás értékelése hipoozmotikus teszt (HOST) segítségével

Hipoozmotikus közegben a spermiumok farka feltekeredik az ozmotikus nyomás kiegyenlítése végett a vízpermeábilis membránján keresztül felvett vízmennyiség miatt. Az elhalt ondósejtek farka hipoozmotikus közegben nem tekeredik fel, ellentétben az élő, ép membránú spermiumfarokkal szemben, így a teszt az élő és holt spermiumok megkülönböztetésére szolgál. Ugyanakkor a spermium egyéb morfológiai értékelését nem teszi lehetővé. Nagy és mtsai (1999) HOST teszt és Tripán kék-Giemsza festést kombinálva végeztek vizsgálatot kanspermán.

4. Áramlási sejtanalízis

Rövid idő alatt nagyszámú sejt (10000 sejt/minta, 1000-2000 spermium/másodperc) mérete, belső összetettsége, élő/elhalt mivolta, akroszómájának épsége, mitokondriumának aktivitása értékelhető az áramlási sejtanalízis segítségével. A spermiumok egyesével jutnak be a citométer mérőkamrájába, ahol lézersugár éri őket. Az általuk visszaverődő fény méretükről, belső szerkezetükről ad információt. A spermiumokhoz korábban kötődő fluoreszcens festékek gerjeszthetők a lézer segítségével és egyéb más paraméterek vizsgálatára is szolgál. Napjainkban akár négy-hat fluoreszcens festék egyidejű használatára is lehetőség van a többlézeres citométerek segítségével.

ANYAG ÉS MÓDSZER

1. A vizsgálatok helyszíne és ideje

A rövid idejű tárolási kísérleteket, valamint a fagyasztott felolvasztott termékenyítő anyagon elvégzett kísérleteket a Nyugat-Magyarországi Egyetem Mezőgazdaság- és Élelmiszertudományi Karának Állattudományi Intézetében, a fázisvizsgálatokat, a fagyasztás előtti, valamint a fagyasztás és újraolvasztás utáni spermakézelési beavatkozásokat a debreceni Mesterséges Termékenyítő Állomáson végeztük el.

2. A laboratóriumok műszerezettsége

2.1. Mikroszkópok

A Kovács és Foote féle módszerrel festett keneteket Olympus CX 41 RF típusú fénymikroszkóppal értékeltük. A fluoreszcens festés esetében IMT2 inverz mikroszkópot használtunk, amely fluoreszcens és normál megvilágítással, fáziskontraszt és Nomarski interferencia feltétellel is rendelkezik. A mikroszkóphoz 10x okulárok mellett 4x, 10x, 20x, 40x planachromat objektív lencsék tartoznak. A fényképezéshez digitális kamera csatlakozik a mikroszkóphoz, mely egy DP10-es színes nyomtatóval van ellátva, illetve a képek közvetlenül a számítógép memóriájában tárolhatók.

2.2. Centrifuga

Janutzki T30 típusú centrifuga segítségével végeztük el a centrifugálásokat.

2.3. Fagyasztó berendezés

A fagyasztásokat Didget Cool programozható fagyasztó berendezéssel végeztük.

3. A spermakezelésekhez használt adalék-anyagok

3.1. A rövid idejű tároláshoz használt hígító

Az Országos Mesterséges Termékenyítő Rt Magyarakeresztúri Állomása által szállított Standard hígító.

3.2. A fagyasztáshoz használt hígítók

3.2.1 I.számú hígító (extender I)

Az extender I. 1000 ml-e a következő komponenseket tartalmazza: 37g glükóz (Sigma G 7528), 6g nátrium citrát (Sigma S 4641), 1,3g nátrium bikarbonát (Sigma S 5761), 1,3g EDTA (Sigma E 0399), 0,8g KCl (Sigma P 3911), 0,6g penicillin (Sigma P 3032), 1g dihidrosztreptomycin (Sigma S 9137).

3.2.2 II. számú hígító (extender II)

100 ml oldat: 80 ml 11%-os laktózoldat (Sigma L 3750) 20 ml tojássárgájával elegyítve.

3.2.3 III. számú hígító (extender III)

100 ml oldat elkészítéséhez a II. számú hígító oldat 89,5 ml-éhez kell 1,5 ml Orvus Es Paste-t és 9 ml glicerint (Sigma G 2289) vegyíteni.

3.3. A felolvasztáshoz használt hígító

A felolvasztáshoz az extender I-et használtunk.

3.4. A centrifugáláshoz használt médiumok

3.4.1 SPERM TL médium

Összetétele:

1. KCl (Sigma P 3911)	23,0 mg/100 ml
2. NaCl (Sigma S 7653)	584,0 mg/100 ml
3. Na ₂ HPO ₄ x H ₂ O (Sigma S 0876) vagy anhydrous	4,0 mg/100 ml
4. HEPES (Sigma H 3375)	238,0 mg/100 ml
5. NaHCO ₃ (Sigma S 5761)	210,0 mg/100 ml
6. Phenol red (Sigma P 3532)	1,0 mg/100 ml
7. Tejsav (Sigma L 6661) (60% szirup)	368,0 µl
8. CaCl ₂ x 2H ₂ O (Sigma C 5080)	31,0 mg/100 ml
9. MgCl ₂ x 6H ₂ O (Sigma M 2670)	8,0 mg/100 ml

3.4.2 SPERM TALP médium

Összetétele:

A SPERM TL médium 10 ml-nyi mennyiségét egészítettük ki a következőkkel:

- | | |
|--|----------|
| 1. Szarvasmarha szérumalbumin (Sigma A 7284) | 60,0 mg |
| 2. Na piruvát (Sigma P 2256) | 1,10 mg |
| 3. Penstrept | 100,0 µl |

(A penstrept összetétele: 10,0 mg streptomycin szulfát (Sigma 6501), 6,13 mg penicillin (Sigma P 7794) 1,0 ml fiziológiás sóoldatban oldva)

3.5. A Percollos kezeléshez használt médiumok

3.5.1 10x médium

- | | |
|--|----------------|
| 1. KCl (Sigma P 3911) | 230 mg/100 ml |
| 2. Na ₂ HPO ₄ (Sigma S 0876) | 35 mg/100 ml |
| 3. NaCl (Sigma S 7653) | 4675 mg/100 ml |
| 4. HEPES(Sigma H 3375) | 2380 mg/100 ml |

A médiumot 7,3 pH értékre állítottam be.

3.5.2 90 %-os Percoll oldat

45 ml Percollt 5 ml 10x médiummal kevertünk el, ezután a következő komponensek kerültek hozzáadásra:

- | | |
|----------------------------------|---------------|
| CaCl ₂ (Sigma C 5080) | 14,5 mg/50 ml |
| MgCl ₂ (Sigma M 8266) | 4,0 mg/50 ml |

NaHCO ₃ (Sigma S 5761)	104,5 mg/50 ml
Tejsav (Sigma L 6661) (60%-os szirup)	0,184 ml

3.5.3 45 %-os Percoll oldat

90 %-os Percoll oldatot elegyítettünk el Sperm TL oldattal 1:1 arányban.

4. Spermvizsgálati módszerek

4.1. Motilitásvizsgálat

A termékenyítő anyag motilitás vizsgálatát fűtött (38 °C) tárgyasztalú Zeiss fénymikroszkóp segítségével egy független szakember végezte.

4.2. Kovács Foote féle festési eljárás (1992)

Kovács és Foote egyszerű és megbízható spermafestési módszerének a lényege a következő:

Az élő/elhalt spermiumok kimutatására a festék 0,25%-os tripánkék (Sigma T 6164) 0,81%-os NaCl-ban oldva (Sigma S 7653). Az élő spermium hátsó része világosan festődik: fehér, vagy halvány rózsaszínű, míg az elhalt spermiumé fekete, sötét ibolya vagy szürke színű. Csakúgy mint a feji rész a spermium farka is festődhet, így membránjának épségét is megtudhatjuk. Nagy és mtsai (1998) megfigyelték, hogy az élő spermiumok nem mindegyike festetlen farkú. Ezeket a sejteket ugyan élőnek tekintjük, de mozgásra képtelenek, így termékenyítésre alkalmatlanok. A vizsgálatainkat követő értékelésben a farkfestést is figyelembe vettük.

Az akroszóma-festék 5-7,5 %-os Giemsa törzsoldat (Sigma GS-500) desztillált vízben. Az ép akroszómák bíborvörösre, a fellazult akroszómák sötét levendulára, a sérültek világos levendula színűre festődnek. Az akroszóma nélküli élő hímivarsejtek fejének elülső része fehér, vagy halvány rózsaszínű, az elhalt akroszóma nélküli sejtek esetében a szín fehér, vagy halványszürke, és a posztakroszómális gyűrű piros.

4.3. A Harrison Vickers fluoreszcens festési eljárás (1990)

A frissen levett termékenyítő anyag hígító oldatba került, melynek összetétele a következő volt:

1. NaCl (Sigma S 7653)	140 mmol
2. Glükóz (Sigma G 7528)	10 mmol
3. K ⁺ (Sigma K 4839)	2,5 mmol
4. polivinil alkohol (Sigma P 8136)	0,5 mg/ml
5. polivinil pirrolidon (Sigma P 2307)	0,5 mg/ml
6. HEPES (Sigma H 3375)	20 mmol

Az oldat pH értékét 20°C-on NaOH (Sigma S 8045) segítségével 7,5-re, ozmolalitását 300 mosmol/kg-ra állítottuk be.

Festékoldatot az alábbi anyagok elegyítésével készítettünk a sóoldat minden ml-ére számítva:

1. Formaldehid törzsoldat (Sigma F 8775)	20 µl
2. Karboxifluorescein diacetát törzsoldat (Sigma C 5041)	20 µl
3. Propidium jodid (Sigma P 4864)	10 µl

A festékoldatot közvetlenül a felhasználás előtt állítottuk össze. Ebbe a médiumba kevertük a már hígított termékenyítő anyagot. A végső spermakonzentrációt 10⁷ sejt/ml-re állítottuk be és 8 percig 30°C-on inkubáltuk

az elegyet. A vizsgálathoz 5 μ l termékenyítő anyagot cseppentettünk a tárgylemezre és letakartuk fedőlemezzel, majd 200-szoros nagyítás mellett 200 spermiumot számoltunk le és értékeltünk a fluoreszcens mikroszkóp alatt.

5. A spermavétel

A rövid ideig tartó tárolási kísérletben felhasznált termékenyítő anyagot adó kanok a Lajta Hanság Rt sertéstelepéről származtak. A rövid idejű centrifugálásos, swim up, és Percollos kezelésben részt vevő kanok a debreceni Mesterséges Termékenyítő Állomás egyedei. A fagyasztási kísérletek helyszíne a debreceni Mesterséges Termékenyítő Állomás volt. Az itt elvégzett kísérletsorozat minden egyes vizsgálatához ugyanazon kanoktól vettünk termékenyítő anyagot. A spermavétel után a vizsgálati anyag közvetlen a laboratóriumba került, ahol azonnal sor került a kísérlet különféle spermakezelési eljárásaira.

6. Statisztikai analízis

A kétféle festési eljárással vizsgált rövid idejű spermatárolás során kapott eredményeket a Statistica program ANOVA/NANOVA részének felhasználásával elemeztük ki.

A hosszabb ekvilibrációs idő hatásának vizsgálati adatait Microsoft Excel segítségével rendeztük és a Statistica for Windows 6.0 statisztikai szoftverrel értékeltük. (Az adatokat variancia-analízis vizsgálatnak vetettük alá a spermakezelési eljárás hatásának kiderítése céljából.) Végül t-próbával igazoltuk a kezelések és a kontroll közti szignifikáns különbséget.

A termékenyítést megelőző spermakezelési eljárások vizsgálatai során kapott eredmények egytényezős variancia-analízisét a már korábban említett Statistica program ANOVA/NANOVA részének felhasználásával végeztük, melyet a Tukey teszttel egészítettük ki, amikor szükséges volt.

EREDMÉNYEK ÉS MEGBESZÉLÉS

1. A spermavizsgálati módszer kiválasztása és a rövid idejű tárolás hatása a termékenyítő anyagra

A gyakorlatban végzett termékenyítő anyag vizsgálatoknál csak az ejakulátum motilitását állapítják meg. A különböző festési eljárásokkal fény derül az élő/elhalt sejtek arányára és az akroszóma integritására is, ezáltal képet kaphatunk a sikeres, vagy a kevésbé sikeres jövőbeli termékenyítő képességről. Újabban a fluoreszcens mikroszkópia az alapvető technikák egyike lett a plazmamembrán integritásának vizsgálatában. Előnye, hogy gyors, kevésbé szubjektív, ezért kevésbé függ a technikai jártasságtól. A fluoreszcens festékeket két nagyobb csoportba lehet sorolni: élő sejteket festő ill. holt sejteket festő festékek.

Vizsgálataink során a Kovács-Foote-féle festést (1992), és a módosított Harrison és Vickers (1990) fluoreszcens festést is alkalmaztuk. A kísérlet célja, hogy a 17°C-on végzett hét napos tárolási kísérlet során in vitro körülmények között naponta megbecsüljük az élő/elhalt spermiumok számát, nyomon követhessük a spermiumok mozgásképességében bekövetkezett változásokat, valamint az akroszóma-változásokat a két festési módszer párhuzamos alkalmazásával összehasonlítva a minták szubjektív motilitás vizsgálataival, majd a további kísérletekben alkalmazott spermavizsgálati módszer kiválasztásra kerüljön.

Ezt a kísérletsorozatot a Nyugat Magyarországi Egyetemen a Lajta Hanság Rt sertéstelepeiről származó négy kan bevonásával végeztük.

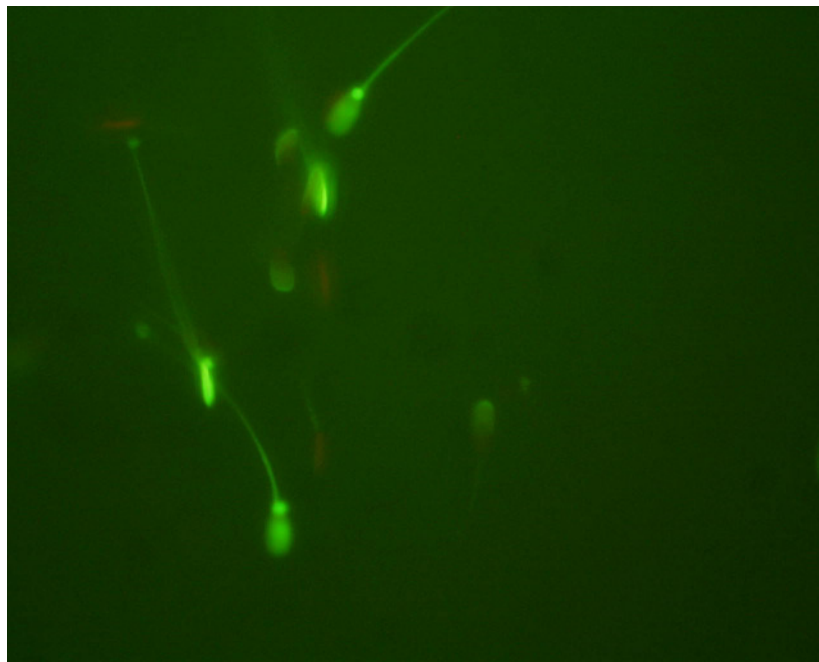
A vizsgálatokhoz négy kantól vettünk ejakulátumot, melyeket ötszörösére hígítottunk. A 17°C-on tartott hígított spermából a vizsgálat hét napja alatt

minden nap mintát vettünk. A mintavétel pipettával történt, mind a hígított spermából, mind a tripánkékből a tárgylemezre egy-egy azonos nagyságú cseppet cseppentettünk, egy másik tárgylemez segítségével összekevertük, és rögtön kenetet készítettünk. A keneteket szobahőmérsékleten függőleges állásban szárítottuk meg. Teljes száradás után a tárgylemezeket két percre rögzítő oldatba merítettük. A rögzítőből való kivételt követően csapvizés és desztillált vizes öblítés következett. Ismételt teljes szárításnak vetettük alá a mintákat, majd a lemezek 24 órára Giemsa-ba kerültek. A festési idő letelte után a tárgylemezeket desztillált vízzel átöblítettük, majd megszártítottuk. A festési eljárást követően minden kenetnél kétszáz spermiumot vizsgáltunk meg 400x - 1000x nagyítással Olympus fénymikroszkóppal. A leszámolt spermiumokat ezután hat különböző kategóriába soroltuk be:

1. Élő, ép akroszómájú, festetlen farokkal
2. Élő, ép akroszómájú, festett farokkal
3. Élő, sérült akroszómájú,
4. Élő, akroszóma nélküli,
5. Elhalt, ép akroszómájú,
6. Elhalt, sérült akroszómájú,
7. Elhalt, akroszóma nélküli spermiumok.

A fluoreszcens festést alkalmazva a kísérlet minden napján a vizsgálandó anyagból mintát vettünk, festettük, és fluoreszcens mikroszkóp alatt kétszáz spermiumot számoltunk le kétszázszoros nagyítás mellett. A spermiumokat négy különböző osztályba soroltuk.

1. Teljesen zölden fluoreszkáló sejt
2. A fej elülső része zölden fluoreszkál, míg a sejt többi része pirosan festődik
3. A posztakroszómális gyűrű zölden fluoreszkál, míg a sejt többi része pirosan festődik
4. Az egész spermium piros festődést mutat



1. ábra. **Különböző osztályba tartozó spermiumok (400x nagyítás)**

1. táblázat. Az élő, ép akroszómájú, farokfestést nem mutató kanspermiumok arányának változása a rövid idejű tárolás alatt a kétféle spermabecslési módszerrel vizsgálva (%)

Kan	Spermavizsgálati módszer	1. nap	2. nap	3. nap	4. nap	5. nap	6. nap	7. nap
1	Kovács-Foote	70	65	59,5	45,5	35,5	30	10
	Fluoreszcens	50	45,5	37	30	27	16	10
2	Kovács-Foote	72	60,5	51,5	31	20	15	10
	Fluoreszcens	45	33	27	19,5	11,5	7,5	5
3	Kovács-Foote	70	65	60,5	46	35	30	25
	Fluoreszcens	53,5	50	45	35,5	32	20	14
4	Kovács-Foote	70	65	53	37,5	28	15	10
	Fluoreszcens	50	45	40,5	34,5	23	11,5	5

A négy kan termékenyítő anyagának előzetes vizsgálatakor az ejakulátumban lévő mozgó spermiumok aránya 70%-ra tehető. A Kovács-Foote-féle eljárást használva a termékenyítő anyag minősége valamivel magasabbnak mutatkozott, mint a fluoreszcens festést alkalmazva. Ez a tendencia végig megmaradt a hét nap során. A vizsgálat során mindkét festési eljárás azt mutatta ki, hogy a termékenyítő anyag minősége napról napra romlik.

A tárolás során az élő, ép akroszómával rendelkező farokfestést nem mutató spermiumok száma folyamatosan csökkent bármely módszert is alkalmaztuk

annak nyomon követésére. Elvégeztük az F-próbát, hogy a kimutatott minőségromlási tendencia azonos mértékben változik-e. A statisztikai értékelésnél négy kan átlageredményeit vettük figyelembe, és a két módszerrel is összehasonlítottuk.

2. táblázat. **Kétmintás F-próba a szórásnégyzetre**

Tényező	SQ	FG	MQ	F-próba	F-táblázati	SZD 5%	SzD 0,1%
Összes	20876,13	55					
Ismétlés	16278,06	6	2713,01			*** P=0,1%	
Csoportok között	2340,071	1	2340,071	24,78491	35,51	***	
Hiba (cs)	566,4911	6	94,41518				
Kezelés csop. Belül	1226,696	6	204,4494	15,83503	4,89	***	3,89893
Hiba (v)	464,8036	36	12,91121				

A fenti táblázatból látható, hogy az F értéke kisebb, mint a kritikus F érték, tehát, a két módszerrel is bemutatott minőségi változások tendenciasorainak szórásnégyzetei között nincs eltérés.

A fenti eredmények azt igazolják, hogy a rövid idejű tárolás során jelentkező spermaminőség romlás a két festési eljárás bármelyikét alkalmazva hasonlóképpen detektálható. A további kísérletek során a Kovács-Foote féle festést alkalmaztuk.



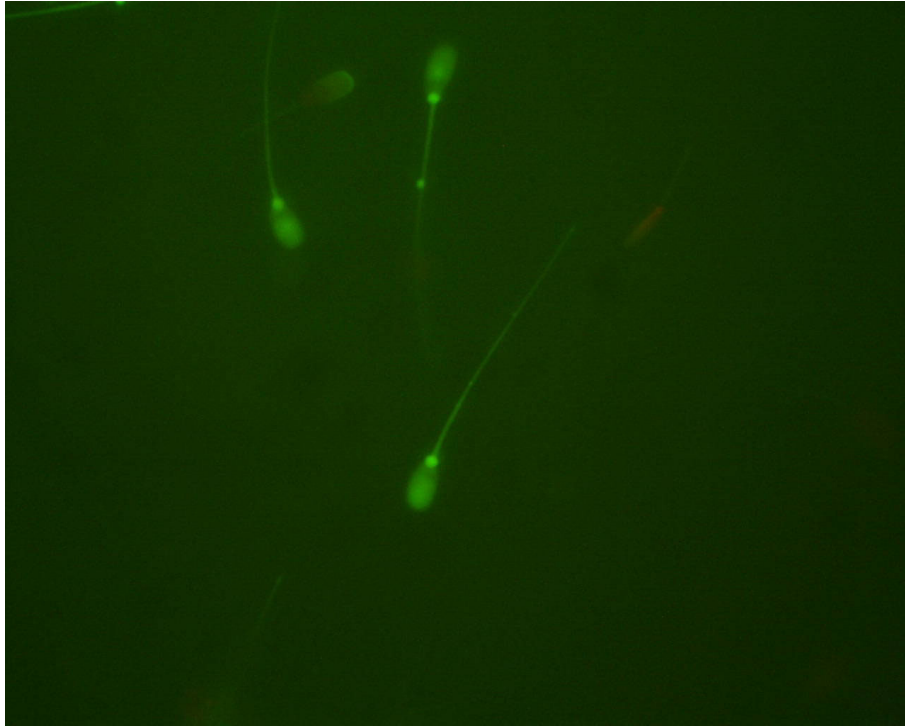
2. ábra. **Élő ép akroszómájú és holt, akroszóma nélküli (középen) spermiumok (1000x nagyítás)**



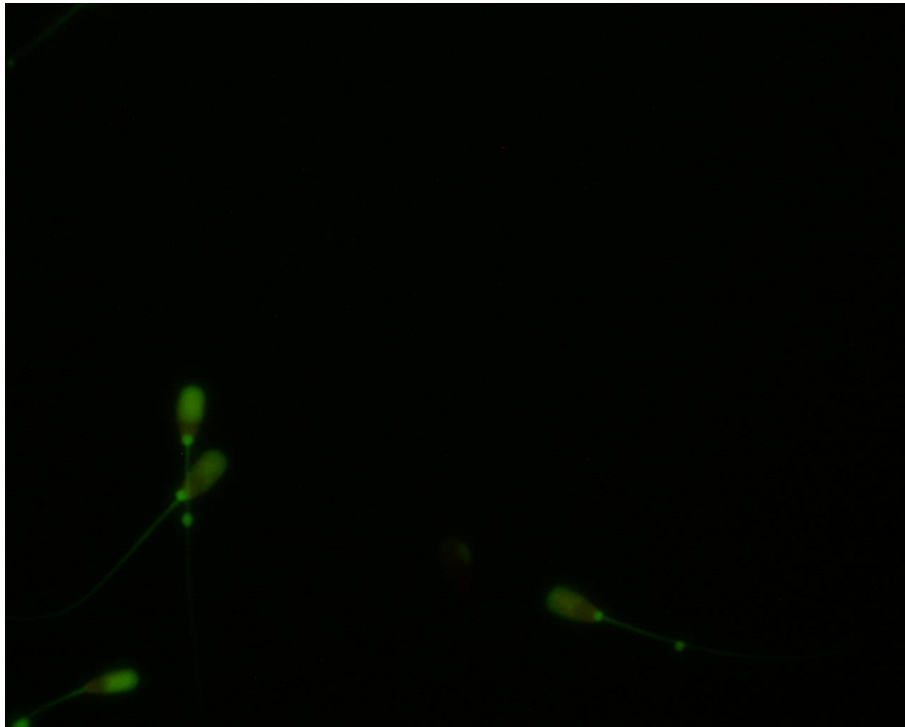
3. ábra. **Holt, sérült akroszómájú (balra), és élő, ép akroszómájú spermiumok (1000x nagyítás)**



4. ábra: Fent élő ép akroszoma nélküli spermium, középen holt fellazult akroszómájú spermium, és élő ép akroszómájú spermiumok (1000x nagyítás)



5. ábra. Néhány I. osztályú spermium fluoreszcens festéssel (400x nagyítás)



6. ábra. Néhány II. osztályú spermium fluoreszcens festéssel (400x nagyítás)

2. A fagyasztás előtti ekvilibrációs idő meghosszabbításának hatása a kanspermiumok membránintegritására

A kísérletbe vont hét kan termékenyítő anyagához szakember segítségével jutottunk hozzá. Elsőként a frissen levett ejakulátum mennyiségét, a spermiumkoncentrációt, és a spermiumok motilitását értékeltük. Ezután 50 ml 30°C-os spermához 150 ml 30°C-os I-es számú hígítót öntöttünk, majd a mintát 15 °C-on három órán át (ekvilibráltattuk) pihentettük egy hőfokszabályozható termosztátban. Az ekvilibráltatás után centrifugálás következett 800g-n 10 percen keresztül hűthető centrifugában. A felülúszó leöntésre került úgy, hogy kb. 25 ml koncentrált sperma maradt az edényben. A mintát ismét hígítottuk a termosztátban tartott 15°C-os II-es számú hígítóval 1:1 arányban. Ezt ismételt pihentetés követte, melyet 5 °C-on két órán át végeztünk. Az 5°C-on tartott III-as számú hígítót ezután adtuk a mintához, hogy elérjük az 100×10^6 /ml-es sejtkoncentrációt. Ezt követően a termékenyítő anyagot 0,5ml-es műszalmába töltöttük és kezdetét vette a fagyasztás. A mintát 5°C-ról 3°C/perces sebességgel -6°C-ra hűtöttük és egy percet állni hagytuk. Ezután -100°C-ra csökkentetük a minta hőmérsékletét 20°C/perces hűtési sebességgel. A végleges tárolás folyékony nitrogénben történt. A felolvasztás során a szalmákat 40 másodpercre 50 °C-os vízfürdőbe helyeztük, majd tartalmukat átöntöttük egy alkalmas tárolóedénybe és szobahőmérsékletű I-es számú hígítóval 5 ml-re egészítettük ki. Felhasználás előtt motilitás és sejtszám értékelésnek vetettük alá. A motilitásvizsgálatkor egy csepp termékenyítő anyagot értékeltünk monitorral összekötött fénymikroszkóp segítségével.

A fagyasztást megelőző különböző spermakezelési lépések után vett spermamintát Kovács és Foote fentebb ismertetett módszerével festettük meg és megállapítottuk az élő, ép és motilis spermiumok arányát. A módszer

alkalmas annak kiderítésére, hogy a fagyasztást megelőző spermakezelések egyes lépései milyen minőség változást okoznak az ejakulátumban. A lépések, melyek után a mintavétel majd a spermavizsgálat történt a következők voltak:

1. Hígítatlan levett sperma
2. 1:1 es hígítás I-es hígítóval
3. Az első ekvilibrációs idő első órájának a végén
4. Az első ekvilibrációs idő második órájának a végén
5. A centrifugálás után
6. A centrifugálást követő II-es hígítás után
7. A második ekvilibrációs idő első órájának a végén
8. A második ekvilibrációs idő második órájának a végén
9. A III. hígítás után
10. A fagyasztás után (I-es hígítóval hígítva 1:1-ben)

Miután megállapítottuk, hogy mely lépések hatottak kedvezően a spermiumok életképességére a debreceni Mesterséges Termékenyítő Állomáson elvégeztük a következő kísérletet is. Az esetleges szezonális különbségek feltárására az egész vizsgálatsorozatot kétszer hajtottuk végre, egyszer a nyár és egyszer az őszi folyamán.

A kísérletbe vont hét kantól ejakulátumot gyűjtöttünk és kétféle előkészítést követően fagyasztottuk le. A minták egyik felét az uppsalai előírást (Larsson 1985) nem változtatva (kontroll), másik felét az I-es számú hígító hozzáadása utáni ekvilibráció idő egy órával való megnövelésével (kezelés). A spermakezelés egyes lépései után minden esetben mintát vettünk, kenetet készítettünk és a Kovács-Foote féle festési eljárást (Kovács és Foote, 1992) alkalmazva fénymikroszkóp alatt 1000-szeres nagyítás mellett vizsgáltuk meg

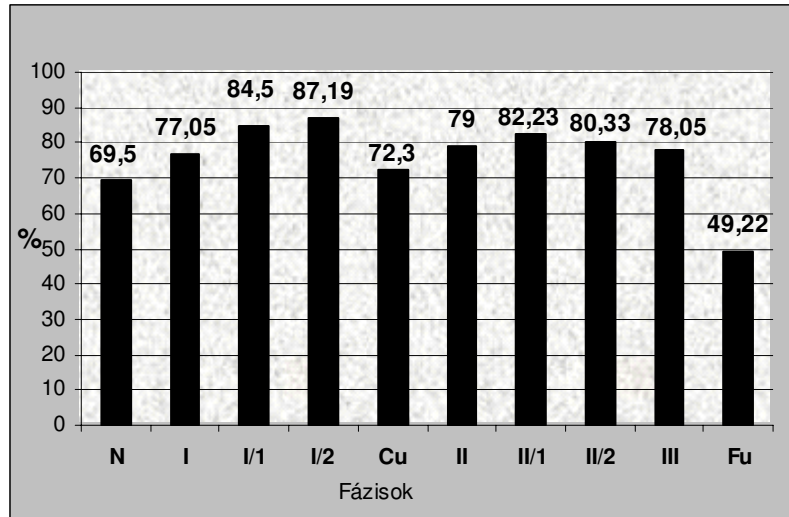
a plazmamembrán és az akroszóma, valamint a farokmembrán épségét (élő, ép akroszómájú ondósejtek %-os aránya), 200-200 sejtet értékelve kenetenként. A friss ejakulátumot, a kétféle (kezelt és kontroll) módon fagyasztott és újraolvasztott minták motilitását is értékeltettük egy független szakemberrel.

A kísérletbe bevont kanok a következők voltak:

1. Magyar lapály (L 206)
2. Magyar lapály (L 216)
3. Duroc x belga lapály (DB 801)
4. Duroc x belga lapály (DB 805)
5. Magyar nagyfehér húsertés (MF 101)
6. Magyar nagyfehér húsertés (MF 107)
7. Duroc (D 401)

Az élő, ép akroszómával rendelkező spermium nem feltétlen alkalmas termékenyítésre. Elengedhetelen, hogy a farokmembrán strukturálisan és funkcionálisan is ép legyen, biztosítva a mozgási képesség alapjait. A vizsgálatok során szükségszerű, hogy a farokfestést is figyelembe vegyük számolva azzal a ténnyel, hogy az élő, ép akroszómájú spermiumok nem mindegyike motilis.

A fagyasztást megelőző számos spermakezelés egyes lépéseinek következményeként különböző mértékben változott az élő, ép és motilis spermiumok számaránya a termékenyítő anyagban. A hígítások és a centrifugálás hatására jelentősen csökkent az élő, ép és egyben motilis spermatozoák aránya. A hígítást követő pihentetések kevésbé csökkentették a vitális, ép és motilis spermiumok arányát. Drasztikus minőségi romlás a fagyasztás alatt következett be.



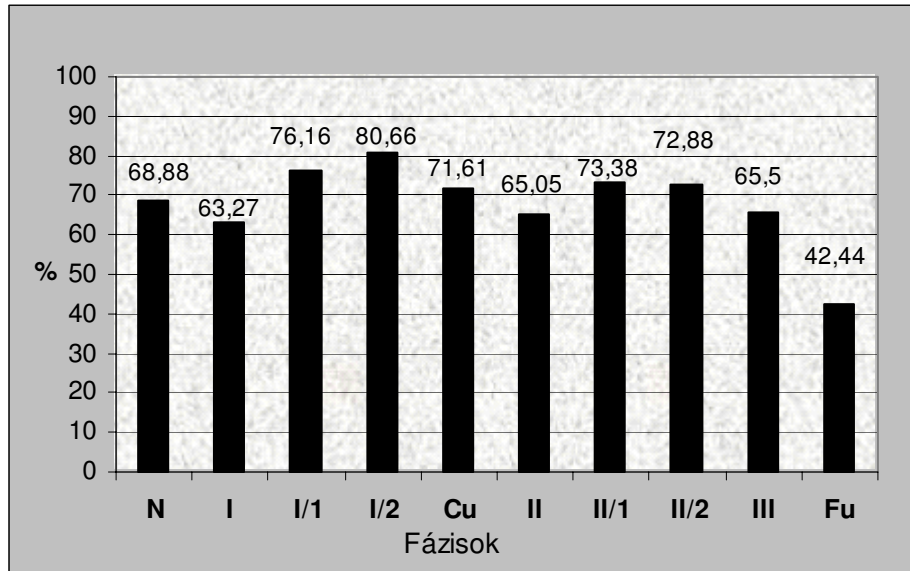
7. ábra Az élő, ép akroszómájú spermiumok számának változása az ősszel végzett spermakezelés és fagyasztás fázisai alatt

Feliratok magyarázata:

- N:* Natív minta 1:1-es hígítással,
I: Az I-es hígító hozzáadása után
I/1: Az első ekvilibráltatás első órája után
I/2: Az első ekvilibráltatás második órája után
Cu: Centrifugálás után
II: A II-es hígító hozzáadása után
II/1: A második ekvilibráltatás első órája után
II/2: A második ekvilibráltatás második órája után
III: A III-as hígító hozzáadása után
Fu: A fagyasztás utáni felolvasztást követően

Az ősszel elvégzett kísérlet eredményeit tartalmazó ábráról a következők olvashatók le. Az első hígítás (közel 8%-os változás) és az azt követő inkubálás (több, mint 7%-os változás) kedvezően befolyásolta a termékenyítő anyag minőségét. A centrifugálás hatására 14,89%-kal, azaz jelentősen csökkent az élő spermatozoák aránya. A második hígítás ismét pozitív változást hozott (6,6%-kal), majd az ezt követő pihentetés első órája nem

rontotta a sperma minőségét (3,23%-os növekedés), de a további egy órás ekvibrálatás enyhén csökkentette a vitális, ép akroszómájú spermiumok arányát. Drasztikus minőségi romlás (28,83%) a fagyasztás alatt következett be.



8. ábra Az élő, ép akroszómájú spermiumok számának változása a a nyáron végzett spermakezelés és fagyasztás fázisai alatt

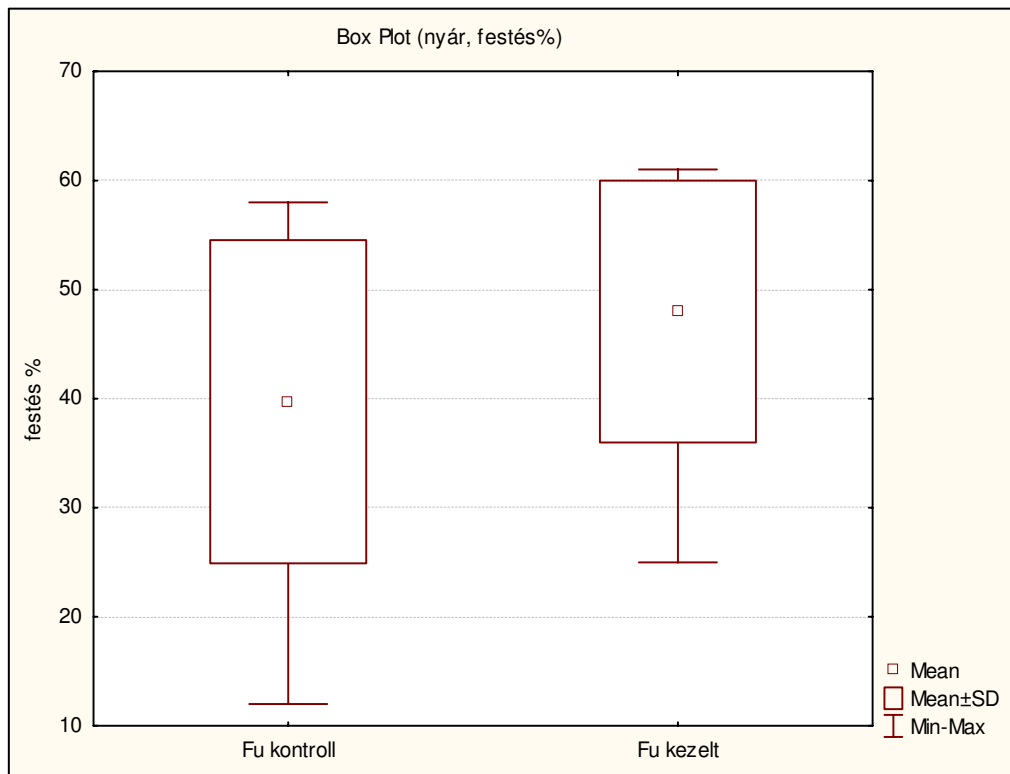
A nyáron végzett kísérletek eredményeit mutató ábráról kiderül, hogy a hígítások mindegyike kedvezőtlenül befolyásolta a sperma minőségét: első hígítás után 5,61%-kal, a második hígítás után 6,60%-kal, míg a harmadik után 7,38%-kal mutatkozott kevesebbnek az élő ép akroszómával rendelkező spermiumok aránya. Az első és a második hígítást követő ekvibrálatás nagyon jó hatással volt a spermiumok életképességére és akroszómájuk integritására. A 15°C-on végzett pihentetés első órája 12,89%-os, míg a második óra további 4,5%-os javulást eredményezett. A centrifugálás nyáron is közel 10%-kal rontotta a kansperma minőségét. A legnagyobb élő sejtszám pusztulás a fagyasztásnak köszönhető: 23,06%.

A rövidebb és hosszabb ekvilibrációs idővel történt fagyasztási kísérletek adatai átlagának és szórásának meghatározását követően az adatok egytényezős statisztikai analízisét is elvégeztük. Külön hasonlítottuk össze a festési adatokat (élő, ép és motilis spermatozoák aránya), és külön a szabad szemmel végzett motilitás vizsgálat adatait. Elsőként a nyáron elvégzett kísérletek eredményeit mutatjuk be.

3. táblázat. Az élő, ép akroszómával rendelkező és farkfestést nem mutató spermatozoák adataira alkalmazott t-próba (nyár)

Nyár	Fu-kontroll festés %	Fu-kezelt festés %
Átlag±	36,8571	51,5714
Szórás	14,2411	6,45128
Szórásnégyzet	202,81	41,619
Szumx	258	361
(Szumx) ²	66564	130321
SQ	1216,857	249,7143
sD	5,909177	
t-táblázati	2,18	
t-próba	2,49	

A Kovács-Foote féle festést alkalmazva a nem festődött spermium farkat tartalmazó csoportot vizsgálva szignifikáns különbség van, a hagyományosan hűtött és a kezelt csoport között. Az alábbi diagram a különbséget is jól szemlélteti.

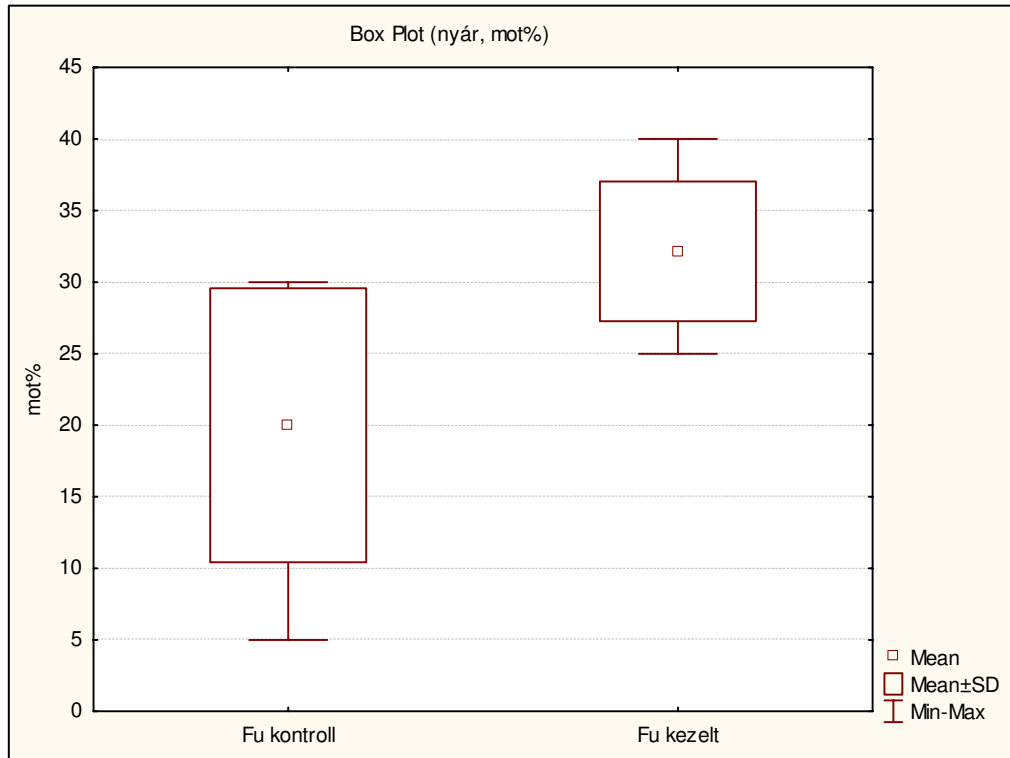


9. ábra: **Box-whisker diagram.** A kontroll és a kezelt csoportok festési adatainak (élő, ép és motilis spermiumok) átlag, átlag±szórás, és minimum-maximum értékei (nyár)

4. táblázat. A motilitásvizsgálat adataira alkalmazott t-próba (nyár)

Nyár	Fu-kontroll mot %	Fu-kezelt mot %
Átlag±	20	32,1429
Szórás	9,57427	4,8795
Szórásnégyzet	91,6667	23,8095
Szumx	140	225
(Szumx) ²	19600	50625
SQ	550	142,857
sD	4,061601	
t-táblázati	2,18	
t-próba	2,99	

Szintén szignifikáns különbség adódott a kontroll és a kezelt csoportok motilitás vizsgálatánál. A különbséget az alábbi diagram mutatja be.



10. ábra: **Box-whisker diagram.** A kontroll és a kezelt csoportok motilitásvizsgálatának átlag, átlag±szórás, és minimum-maximum értékei (nyár)

Mind a kezelt, mind a kontroll csoporton belüli vitalitást és motilitást együttesen feltáró festési eredményeket összehasonlítva a szabad szemmel végzett motilitási eredményekkel azt tapasztaltuk, hogy a közöttük adódó különbségek szignifikánsak.

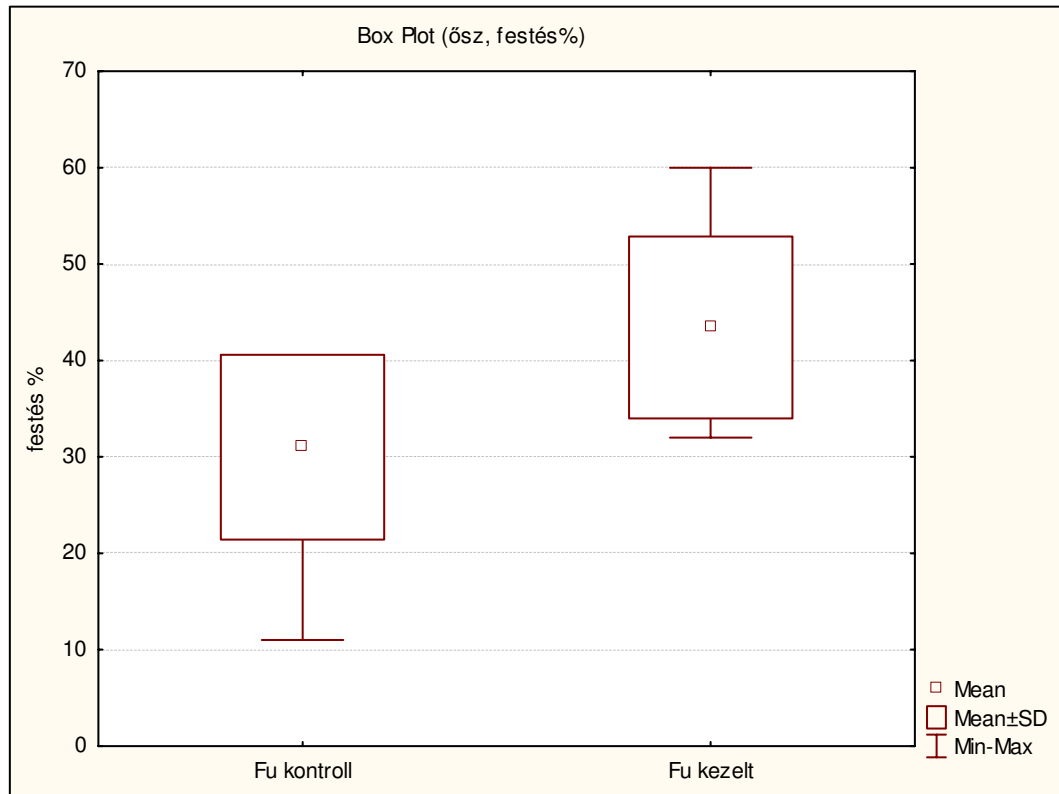
5. táblázat A kezelt csoport festési és szabad szemmel végzett motilitásvizsgálatainak adataira végzett t-próba

Nyár	Fu-kezelt festés %	Fu-kezelt mot %
Átlag±	48	32,1429
Szórás	12	4,8795
Szórásnégyzet	144	23,8095
Szumx	336	225
(Szumx)	112896	50625
SQ	864	142,857
sD	4,896201	
t-táblázati	2,18	
t-próba	3,24	

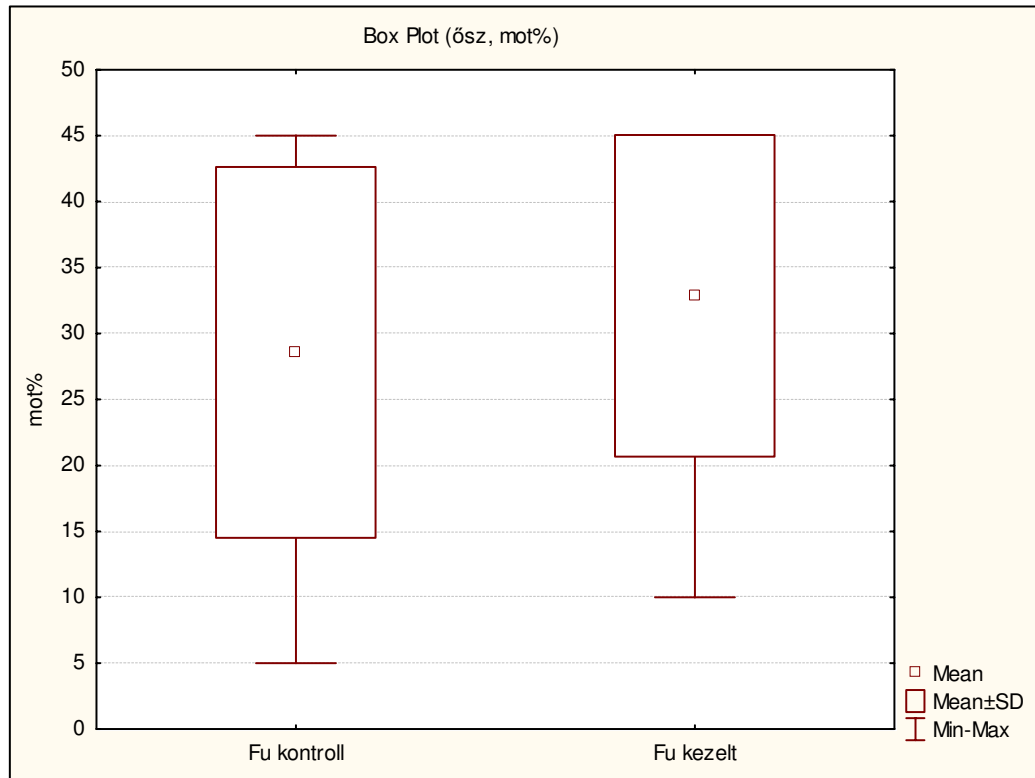
6. táblázat A kontroll csoport festési és szabad szemmel végzett motilitásvizsgálatainak adataira végzett t-próba

Nyár	Fu-kontroll festés %	Fu-kontroll mot %
Átlag±	39,7143	20
Szórás	14,8179	9,57427
Szórásnégyzet	219,571	91,6667
Szumx	278	140
(Szumx) ²	77284	19600
SQ	1317,43	550
sD	6,66803	
t-táblázati	2,18	
t-próba	2,96	

Az ősszel elvégzett kísérletek kontroll és kezelt csoportjainak adatai között annak ellenére, hogy közöttük lényeges eltérések láthatók, nincs szignifikáns különbség. Az alábbi diagramok ezeket az eredményeket mutatják be.



11. ábra: **Box-whisker diagram.** A kontroll és a kezelt csoportok festési adatainak (élő, ép és motilis spermiumok) átlag, átlag±szórás, és minimum-maximum értékei (ősz)



12. ábra: **Box-whisker diagram.** A kontroll és a kezelt csoportok motilitásvizsgálatának átlag, átlag±szórás, és minimum-maximum értékei (ős)

A nyáron és ősszel elvégzett kísérletek eredményeit átlagoltuk és elvégeztük a t-próbát. Összehasonlítottuk a kezelt és a kontroll csoportok átlageredményeit külön az életképességet és motilitást feltáró festés esetében, és külön a mozgásvizsgálat tekintetében. Mind a festési eredmények, mind a szabad szemmel végzett motilitás eredmények statisztikai vizsgálatok szignifikáns eltérés volt kimutatható a kezelt csoport javára. Az egyes egyedek eredményeit is összehasonlítva azt tapasztaltuk, hogy közöttük nincs szignifikáns különbség. A nyáron és az ősszel elvégzett kísérletek eredményei között sem adódott szignifikáns eltérés.

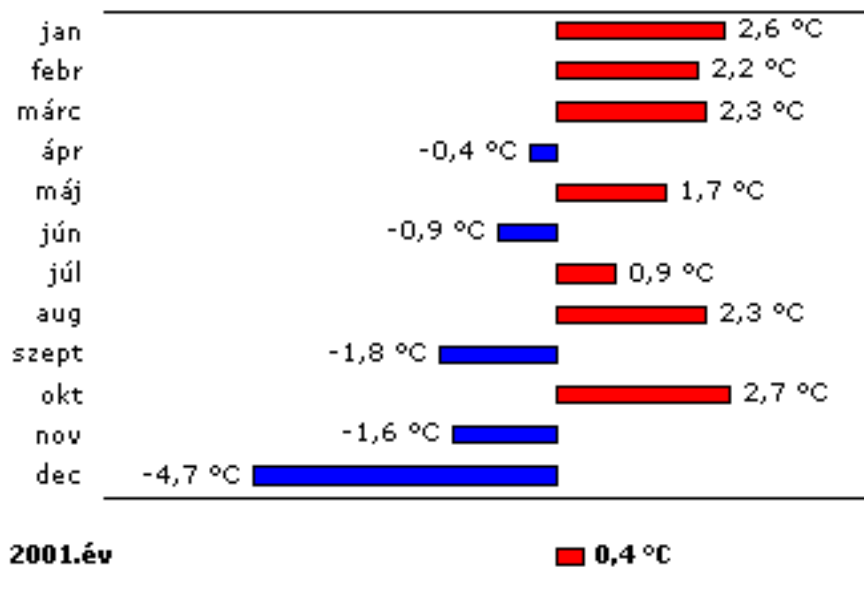
7. táblázat A nyári és őszi festési (életképesség és motilitás) adatok átlagolására elvégzett t-próba

Átlag	Fu-kontroll festés %	Fu-kezelt festés %
Szórás	8,8149	5,04975
Szórásnégyzet	77,7024	25,5
Szumx	237,5	332,5
(szumx) ²	56406,3	110556
SQ	466,2143	153
sD	3,839687	
t-táblázati	2,18	
t-próba	3,53	

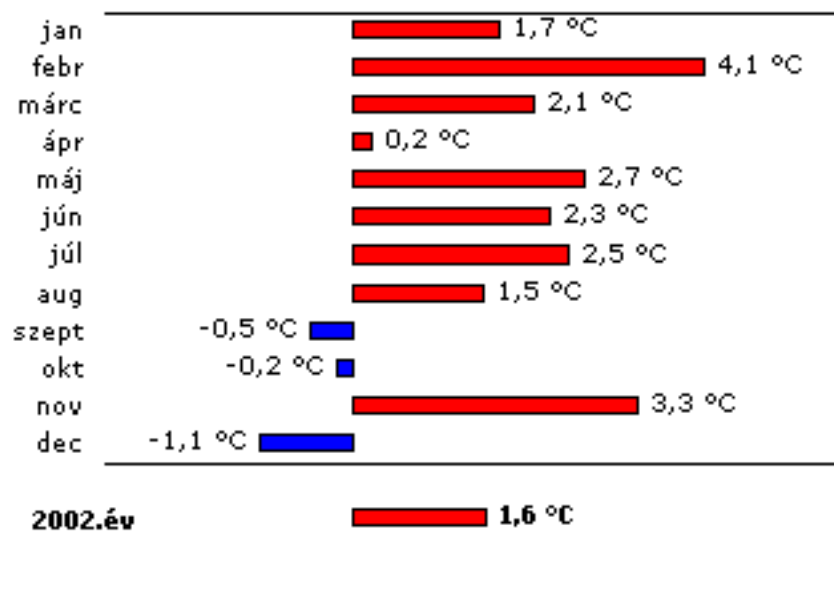
8. táblázat A nyári és őszi szabad szemmel végzett motilitási adatok átlagolására elvégzett t-próba

Átlag	Fu-kontroll mot %	Fu-kezelt mot %
Átlag±	23,9286	32,5
Szórás	8,2736	5,59017
Szórásnégyzet	68,4524	31,25
Szumx	167,5	227,5
(szumx) ²	28056,3	51756,3
SQ	410,714	187,5
t-táblázati	2,18	
t-próba	2,27	

A termékenyítő anyagok minőségének vártnál kisebb szezonális különbségeire a vizsgálatok elvégzésekor mért hőmérsékleti átlagok adhatnak részben magyarázatot. Mindkét évben jelentős különbség tapasztalható az őszi kísérletek idején (október, illetve november) mért átlaghőmérsékletek tekintetében a sok éves átlaghoz képest.



Forrás: www.omsz.htm



Forrás: www.omsz.htm

3. Fagyasztás és felolvasztás utáni spermakezelés (rövid idejű centrifugálás, swim-up és Percollos kezelés)

A kísérletet három egymás követő napon végeztük, naponta egy kan termékenyítő anyagára alkalmaztuk a három kezelést. A kísérlethez az egyes kanok termékenyítő anyagát tartalmazó műszalmákat egy kantomól összesen hatot 37°C-os vízfürdőbe helyeztük egy percre, majd tartalmukat 37°C-ra előmelegített Eppendorf csőbe ürítettünk és homogenizáltunk.

A fagyasztott újraolvasztott termékenyítő anyagokból mind a kezelések előtt, mind a kezelések után mintát vettünk és megvizsgáltuk a sperma különböző paramétereit. A motilitás és a spermiumkoncentráció meghatározásához 5 µl spermát, míg az életképesség és az akroszóma integritásának tanulmányozásához 10 µl-nyi spermát használtunk fel. A motilitás vizsgálatát minden esetben elvégeztük, a sejtkoncentráció meghatározása Bürker-kamra segítségével történt, desztillált vízzel történő 10-szoros illetve 100-szoros hígítást követően. Az életképesség és az akroszóma integritásának megállapításához a Kovács-Foote féle festést alkalmaztuk.

3.1. Centrifugálás

Az előkészített, homogenizált termékenyítő anyag 130 µl-nyi mennyiségét 6 ml 37°C-os Sperm TALP médiumra pipettázuk, majd 200g-n 10 percen át centrifugáltuk. Ezt követően a felülúszót eltávolítottuk és a megmaradt pelletet 130 µl médiumba reszuszpendáltuk.

3.2. Felúsztatás (swim up) (Parrish és mtsai 1988)

A kísérlethez előkészített termékenyítő anyagból 130 µl mennyiséget rétegeztünk egy centrifugacsőbe Sperm TALP médium alá. A csövet és tartalmát 38,5°C-on termosztátban egy órán át inkubáltuk. A CO₂ szintet a légköri értékre csökkentettük, hogy a Sperm TALP médium savasodását elkerüljük és a spermiumok ez okból történő pusztulását megelőzzük. Az inkubálás után a médium tetejéről 770 µl mennyiséget szívtunk le és 3 ml Sperm TALP médiumra engedve 10 percen át 200g értéken centrifugáltuk. A művelet végén a felülúszót eltávolítottuk, és a megmaradt anyagot 130 µl médiumba reszuszpendáltuk a korábbi centrifugálásos eljáráshoz hasonlóan.

3.3. Percollos kezelés (Parish és mtsai 1993)

A kónikus aljú centrifugacső aljára 2 ml 90%-os Percoll oldatot pipettáztunk, majd erre 2 ml 45%-os Percoll oldatot rétegeztünk úgy, hogy a két frakció ne keveredhessen. A 90%-os opálosan áttetsző Percoll alul, míg a 45%-os ciklámen színű Percoll felette helyezkedett el, így bizonyosodtunk meg a két frakció biztos elkülönüléséről. Miután az elegy szobahőmérsékletre melegedett óvatosan két műszalmányi spermát rétegeztünk az oldat tetejére, majd 200 g értéken 10 percen át centrifugáltuk. A felülúszót közvetlen a centrifugálás után azonnal leszívtuk, ezzel biztosítottuk, hogy az eltávolításra kerülő frakcióban minél kevesebb élő mozgóképes spermium legyen, mivel a centrifugálást követően az élő mozgásképes spermiumok azonnal elkezdnek visszaúszni a felsőbb rétegekbe. A centrifugacső alján maradt pellet 130 µl steril, 37°C-os Sperm TALP médiumban reszuszpendáltuk.

3.4. A motilitás értékelése

9. táblázat. A spermakezelési eljárások utáni motilitási eredmények 100-szoros hígítást követően (%)

Kanok	Kezelés előtt (kontroll)	Centrifugálás	Felúsztatás	Percoll
72.	60	55	70	80
121.	55	50	60	75
74.	45	50	55	70
Átlag	53,33	51,66	61,66	75

A táblázat adatait értékelve megállapítható, hogy a felúsztatásos és a Percollal történő kezelés hatására több mozgó spermiumot tartalmazott a termékenyítő anyag a három kan átlagait nézve. A centrifugálás hatására a motilitási átlagértékek nem lettek jobbak.

3.5. A spermium-koncentráció értékelése

10. táblázat Az egyes kezelések utáni spermium-koncentráció (db/ μ l)

Kan	Kezelés előtt (kontroll)	Centrifugálás	Felúsztatás	Percoll
72.	156.400	196.600	1000	31.400
Ismétlés		153.400	2600	34.800
121.	146.200	138.400	800	3400
Ismétlés		106.800	1000	5200
74.	214.800	337.200	200	7200
Ismétlés		230.400	1600	3000
Átlag	172.466	193.800	1200	14166

A három kan adataiból kitűnik, hogy a centrifugálás után a spermiumkoncentráció meghaladta a kontroll értéket, ugyanakkor a felúsztatás és a Percollos kezelést követően a spermium-koncentráció lényegesen csökkent.

3.6. Az életképesség és az akroszóma integritásának értékelése

11. táblázat. Az élő ép akroszómájú spermiumok arányának alakulása a kezelések előtt és a kezelések hatására (%)

Kan	Kezelés előtt (kontroll)	Centrifugálás	Felúsztatás	Percoll
72.	37,8	59,2	59	84,5
121.	34,5	57,7	49,6	62,9
74.	34,3	54,5	44,4	74
Átlag	35,53	57,13	51,00	73,80

A táblázat adataiból leolvasható, hogy mindhárom kezelést követően az élő, ép akroszómájú spermiumok aránya magasabb a kontrollhoz képest. Sertés fajnál a legjobb eredményt a Percollos kezelés indukálta, ezt a centrifugálás, majd a felúsztatás követte.

12. táblázat. A statisztikai minta alapadatai

	Darabszám	Összeg	Átlag	Variancia
Kezelés előtt (kontroll)	3	106,6	35,5	3,8
Centrifugálás	3	171,4	57,1	5,7
Felúsztatás	3	153,0	51	54,7
Percoll	3	221,4	73,8	116,6

13. táblázat. Az élő, ép akroszómájú spermiumokra vonatkozó adatok variancia analízise

Tényezők	SS	df	MS	F	p-érték	F kritikus
Csoportok között	2254,013	3	751,3378	16,59895	0,000852	4,06618
Csoporton belül	362,113	8	45,26417			
Összesen	2616,127	11				

Látható, hogy az F számított érték nagyobb az F kritikus értéknél, melyből megállapítható, hogy az élő, ép akroszómájú spermiumok mennyiségi értékei közötti különbségek a kezelések hatására jöttek létre.

14. táblázat. Az SZD %-ok

Kezelések	SZD %
Kontroll – centrifugálás	12,7
Kontroll – felúsztatás	10,2
Kontroll – Percoll	14,6

A számított SZD 5%=10,39***. A kontroll és a kezelések közötti ennél nagyobb különbség a kezelésnek tulajdonítható P=5%-os szinten. A kontroll és az egyes kezelések közötti szignifikáns különbség igazolására elvégeztük a t-próbát.

15. táblázat. **t-próba a kontroll és a centrifugálásos kezelés összehasonlítására**

	Kontroll	Centrifugálás után
Várható érték	35,53333333	57,13333333
Variancia	3,863333333	5,763333333
Megfigyelések	3	3
Feltételezett átlagos eltérés	0	
df	4	
t érték	-12,05803143	
P (T<=t) egyszélű	0,000135631	
t kritikus egyszélű	2,131846486	
P(T<=) kétszélű	0,000271263	
t kritikus kétszélű	2,776450856	

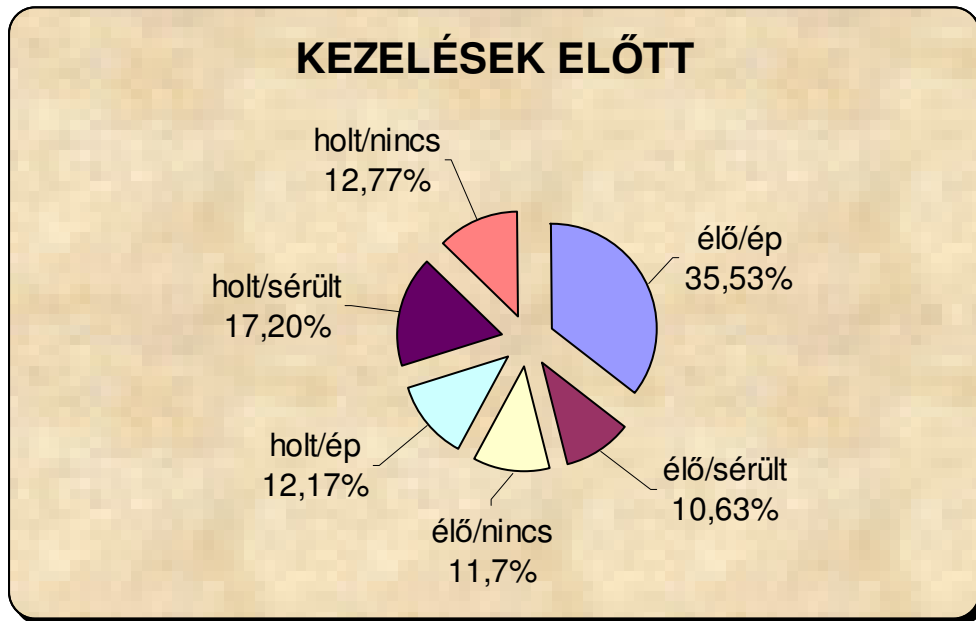
16. táblázat. **t-próba a kontroll és a felúsztatásos kezelés összehasonlítására**

	Kontroll	Felúsztatás után
Várható érték	35,53333333	51
Variancia	3,863333333	54,76
Megfigyelések	3	3
Feltételezett átlagos eltérés	0	
Df	2	
t érték	-3,498824015	
P (T<=t) egyszélű	0,036435546	
t kritikus egyszélű	2,91998731	
P(T<=) kétszélű	0,072871092	
t kritikus kétszélű	4,302655725	

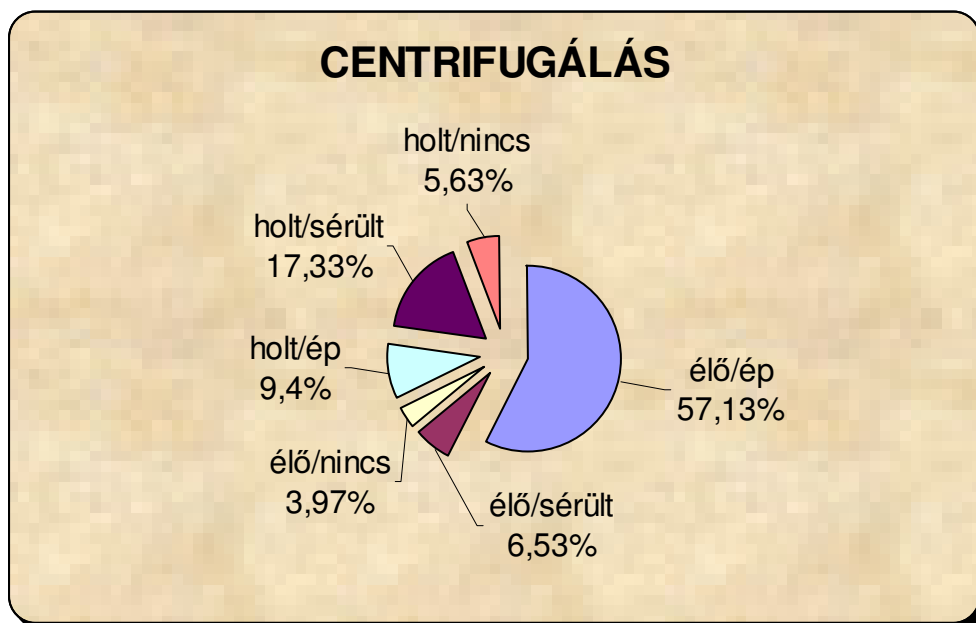
17. táblázat. **t-próba a kontroll és a percollos kezelés összehasonlítására**

	Kontroll	Percoll-os kezelés után
Várható érték	35,53333333	73,8
Variancia	3,863333333	116,67
Megfigyelések	3	3
Feltételezett átlagos eltérés	0	
df	2	
t érték	-6,037090373	
P (T<=t) egyszélű	0,013189779	
t kritikus egyszélű	2,91998731	
P(T<=) kétszélű	0,026357557	
t kritikus kétszélű	4,302655725	

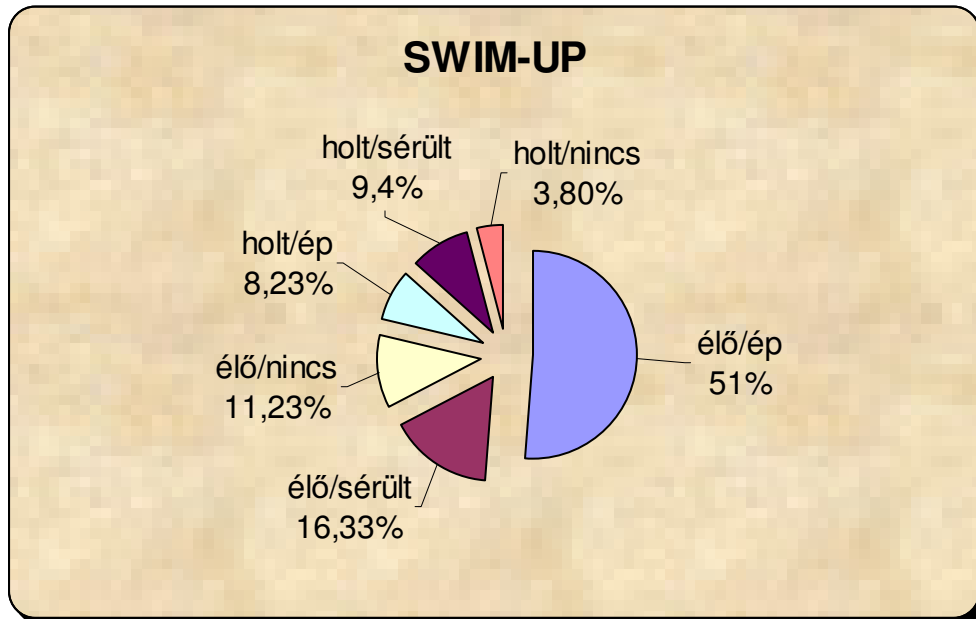
A táblázat adataiból leolvasható, hogy a t értékek mindhárom kezelést alkalmazva magasabbak a kritikus t értékeknél, tehát a kontroll és a kezelés adatai közötti különbség szignifikáns ($P=0,05$).



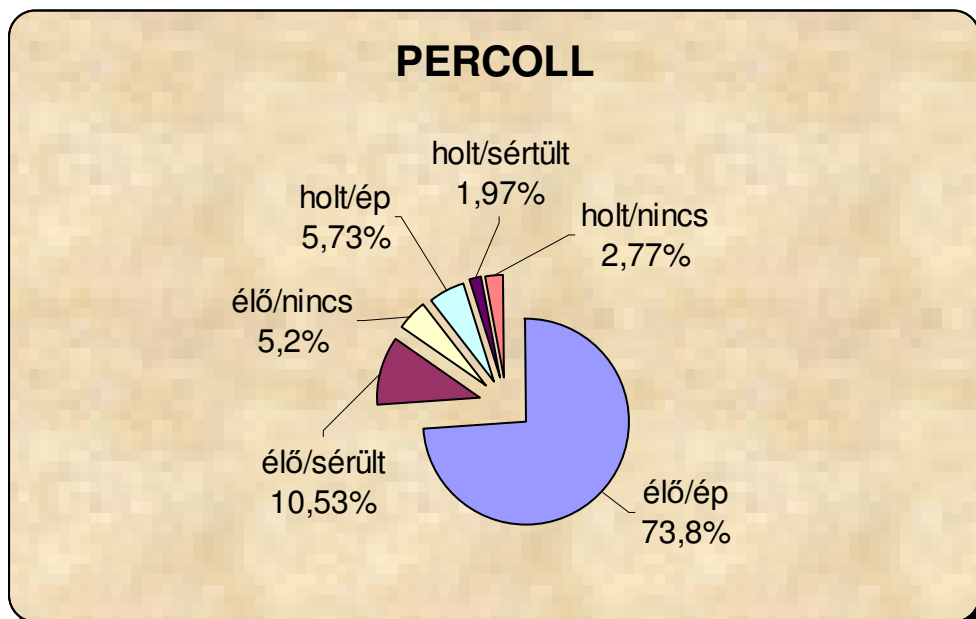
13. ábra. A különböző spermiumkategóriák alakulása a kezelés előtt



14. ábra. A különböző spermiumkategóriák alakulása a centrifugálás után



15. ábra. A különböző spermiumkategóriák alakulása a felúsztatás után



16. ábra. A különböző spermiumkategóriák alakulása a Percollos kezelés után

A kísérleti eredmények azt mutatták, hogy az élő (ép membránú és akroszómájú) spermiumok aránya a három vizsgált kan esetében 35,53% volt a kezelések előtt, 57,13% a centrifugálásos kezelés, 51% a felúsztatás és 73,80% a Percollos kezelés után. Mind a centrifugálás, mind a felúsztatás, mind a Percoll kezelés szignifikánsan ($P < 0,005$) befolyásolta az élő, intakt akroszómával rendelkező spermatozoák arányát a termékenyítő anyagban.

Az eredményeket analizálva megállapítható, hogy a kanspermiumok életképességére és a plazmamembrán integritására legkedvezőbb hatással a Percollos kezelés bizonyult, ezt a rövid idejű centrifugálás végül a felúsztatás követte.

ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK

1. A hosszabb ideig tartó ekvilibráltatás kedvező hatással volt a spermiumok életképességére, az élő, ép akroszómájú és motilis spermiumok aránya szignifikánsan magasabb volt a hosszabb pihentetést követően, mint a kontroll esetében.
2. Kísérleteinkben a hosszabb ekvilibráltatás a spermiumok mozgási képességében is eltérést okozott, mely a variancia analízis alapján szignifikánsnak bizonyult.
3. Az in vitro fertilizáció hatékonyságának növeléséhez alkalmazott swim up, centrifugálás, Percoll grádiens spermakezelési eljárások bármelyikének jelentősen nagyobb mennyiségű életképes, ép akroszómájú spermiumot eredményezett, mint a kezelés nélküli kontroll.
4. A különböző kezelések közül a Percoll grádiens kezelés bizonyult a leghatékonyabbnak.

KÖVETKEZTETÉSEK, JAVASLATOK

Az értékes tenyészkánok kiválasztása döntő fontosságú a mesterséges termékenyítésben. Az értékes gének mellett az is szükséges, hogy az IV-be bevont állat megfelelően termékeny legyen. A különféle spermavizsgálati paraméterek és a termékenység közötti összefüggést vizsgálva Jounala és mtsai (1998) azt találták, hogy, a hét napig tárolt hígított sperma vizsgálati eredményei és a termékenység között összefüggés van, így kizselektálhatók az igazán termékeny kanok. A kansperma rövid idejű tárolása alatti minőségi változásának nyomon követésére kétféle in vitro módszert használtunk. Vizsgálataink során a Kovács-Foote-féle (1992) festést, és a módosított Harrison és Vickers fluoreszcens festést (1990) alkalmaztuk. A 17°C-on végzett hét napos tárolási kísérlet alatt in vitro körülmények között naponta értékeltük az élő/elhalt spermiumok számát, megállapítottuk az akroszóma változásokat, és az élő, ép akroszómájú spermiumok farokmembránjának permeabilitásából a sejt motilitására is következtítettünk. Összehasonlítottuk a vitális festési eredményeket a motilitás vizsgálat eredményeivel. Mindkét módszer alkalmas a rövid ideig történő tárolás folyamán bekövetkező minőségbeli változások nyomon követésére. A gyakorlatban mégis a Kovács és Foote által leírt módszert javasoljuk, mert kivitelezése egyszerű, nem igényel speciális laboratóriumi körülményeket, és a sejtek vitalitásán kívül az akroszóma és a farokmembrán integritásáról is árnyalt képet kapunk.

Hosszú idejű tárolás során a spermiumokat fagyasztják, ebben az állapotban tárolják és felolvasztják, majd termékenyítenek velük. A sertés spermiumok bármiféle tartósítása, de különösen a fagyasztás és az azt követő felolvasztás csökkent életképességet eredményeznek (Paulenz és mtsai 1995). A sikeres termékenyítést nehéz előre megjósolni a fagyasztott felolvasztott sperma in vitro minőségi becsléséből (Woelders 1990). Egyes tulajdonságok, mint a

normál akroszóma (Xu és mtsai 1998), normál fej és fark morfológia (Gadea és Matas 2000), és a progresszív előrehaladó mozgás (Ivanova és Mollova 1993, Flowers 1997) pozitív összefüggést mutatnak a termékenyítő képességgel.

Az akroszóma épségének és a plazmamembrán integritásának vizsgálati eredménye jól jelzi a sperma minőségét, és gyakran használják a fagyasztott és felolvasztott sertés sperma életképességének becslésére (Vazquez és mtsai 1999). Vizsgálatunkban a friss ejakulátum motilitási eredményeiből nem lehet következtetni az ugyanazon kantól származó fagyasztott felolvasztott sperma várható motilitási eredményeire; jelezve, hogy az egyes kanok termékenyítő anyagának fagyaszthatósága között jelentős különbség van. A tárolt sertés spermiumok rövid ideig élnek a női nemi szervekben (Pursel és mtsai 1978b), ezért a 37,8°C-on történő 4 órás inkubálás utáni spermaminőség vizsgálat pontosabb információt ad a sertés spermium termékenyítő képességéről, mint a felolvasztást követő azonnali motilitási vizsgálat (Larsson és Einarsson 1976b).

A hőmérséklet változása jelentősen befolyásolja a kanspermium fej plazma membránjának permeabilitását (Canvin és Buhr 1989). A membrán épségének megőrzése kulcsfontosságú e tekintetben. Az ekvilibrációra azért van szükség, mert elősegíti a spermiumok fagyasztás és felolvasztás alatti károsodásokkal szembeni ellenállását. A rezisztencia kialakulása valószínűleg a spermium membránjának a szeminális proteinekkal való interakciójának köszönhető (Pavelko és Crabo 1976). Kísérleteinkben az ekvilibrációs idő meghosszabbítása kedvező hatással volt a spermiumok életképességére, az élő, ép akroszómájú és motilis spermiumok aránya szignifikánsan magasabb volt a hosszabb pihentetést követően, mint a kontroll esetében. A motilis spermiumok aránya az ekvilibrációs idő előrehaladtával fokozatosan nő (Pavelko és Crabo 1976). Kísérleteinkben a hosszabb pihentetés a spermiumok

mozgási képességében is szignifikáns változást okozott. A fagyasztás előtti kezelés alatti pihentetés hatására mind a nyári, mind az őszi mintákban az élő, ép akroszómájú sejtek arányának, bár nem szignifikáns de kisebb mértékű emelkedése meglepő. Nagy és mtsai (2004) fagyasztott felolvasztott bikasperma négy órás inkubálásának első fél órájának végén azt tapasztalták, hogy az élő, ép akroszómájú sejtek aránya kis mértékben emelkedett, ezzel párhuzamosan a holt/ép akroszómájú sejtek aránya csökkent.

A petesejt megtermékenyítése egy bonyolult, sok lépésből álló folyamat, amely számos fiziológiai és biokémiai eseményt, beleértve a hiperaktivációt, a kapacitációt, az akroszómareakciót, a zona pellucidán való penetrációt, a petesejt plazmamembránjához való kötődést, a hím pronukleusz kialakulását (Sirard és mtsai 1993) foglal magába. Csak az élő, ép akroszómával rendelkező motilis spermiumok képesek termékenyíteni. A lépések bármelyikének elégtelensége sikertelenséghez vezet. Javasoljuk a fagyasztva történő tárolás előtti spermakezelési eljárások alkalmával az első hígítást követő ekvibrálás idejének egy órával történő meghosszabbítását.

Feltétlen javasoljuk a kétféle fagyasztási eljárás eredményeként létrejött jelenleg folyékony nitrogénben tárolt termékenyítési anyagokkal történő vissza-termékenyítések elvégzését, hogy ellenőrizzük a két hűtési eljárás alkalmasságát.

A fagyasztott visszaolvasztott termékenyítő anyagon számos kutató végzett el Percoll-os és swim up-os kezelést. Néhányan a Percoll gradiens kedvezőbb hatásairól számoltak be a spermium motilitása, morfológiája és az IVF utáni vemhesülési ráta tekintetében. (Akerlof és mtsai 1987, Menkveld és mtsai 1990, van der Zwalmen és mtsai 1991). Ezzel ellentétben Engler és mtsai (1992) azt tapasztalták, hogy a felúsztatás alacsonyabb spermakonzentrációt, de jobb spermaminőséget eredményezett, mint a Percoll-os kezelés. Brandies és munkatársai azt találták, hogy a swim up hatására több motilis spermium

szelektálható ki, mint a Percollal történő kezelés után, ugyanakkor a Percollal szignifikánsan több ép akroszómájú spermatozoa koncentráldik. Többen arról írtak, hogy nincs különbség a kétféle kezelésben részesült spermiumok minősége között. (Punjabi és mtsai 1990, Chan és mtsai 1991, Morales és mtsai 1991, Check és mtsai 1992, Sapienza és mtsai 1993)

Munkánkban a három különféle kezelés eredményei igazolták, hogy mind a rövid idejű centrifugálás, mind a felúsztatás, mind a Percollos kezelés hatékonyan koncentrálja az élő, ép akroszómával rendelkező spermiumokat. Hasonló eredményeket kaptak Somfai és munkatársai (2002) szarvasmarha spermiumok előkezelése során.

A mélyhűtött kanspermával történő mesterséges termékenyítés gyakorlata hazánkban még gyerekcipőben jár. A nagyüzemi sertéstermelésben az egyszerűen kivitelezhető Percollos előkezelést feltétlen javasoljuk, hogy a mesterséges termékenyítés tökéletesebbé váljon, és szélesebb körben elterjedhessen.

ÖSSZEFOGLALÁS

A sertésenyésztésben is egyre nagyobb teret kap a mesterséges termékenyítés, melyhez akár több száz kilométerről szállított fagyasztott termékenyítő anyagot használnak fel. Egy részről csak azokat a kanokat vonják be a mesterséges termékenyítésbe, melyek spermája megfelelő minőségű, más részről a különféle feldolgozási technikák (spermavételi, hígítási, fagyasztási, tárolási technológia) gyenge pontjait fel kell ismerni. Ennek kiderítésére számos spermavizsgálati módszert dolgoztak ki szerte a világban. Kísérletsorozatunk első lépéseként két spermavizsgálati módszert hasonlítottunk össze rövid ideig történő kansperma tárolása folyamán, azzal a céllal, hogy kimutassuk a tárolás alatt törvényszerűen bekövetkező spermiumpusztulás mértékét. Négy magyar fehér sertésfajtától vettünk le ejakulátumot, melyet hét napig 17°C-on tároltunk. Naponta mintát vettünk, és keneteket készítettünk. A Kovács és Foote által kidolgozott festést (1992), valamint Harrison és Vickers fluorescens festését is (1990) alkalmazva naponta megállapítottuk a sperma minőségét.

A rövid idejű tárolási kísérletben használt kétféle festési eljárás kimutatta, hogy az élő, ép akroszómájú sejtek aránya a napok előrehaladtával fokozatosan csökkent, ezzel korrelálva a holt sejtek száma növekedett. A Kovács-Foote-féle festés kivitelezése egyszerű, nem igényel speciális laboratóriumi körülményeket és a spermiumok életképességén kívül akroszómájuk integritásáról is árnyalt képet kapunk, továbbá a farokfestés figyelembevételével a spermium mozgási képessége is megállapítható.

Fázisvizsgálataink célja az volt, hogy a fagyasztás előtti különféle spermakezelési eljárásoknak és a mélyhűtésnek a spermiumok életképességére gyakorolt hatását kiderítsük, megállapítva a beavatkozások gyenge pontjait. Az esetleges szezonális különbségek kiderítésére a kísérletet nyáron és ősszel

is elvégeztük. Hét kantól vettünk le termékenyítő anyagot és előkezelést követően lefagyasztottuk. Az eljárás bizonyos lépései után, összesen tíz alkalommal mintát vettünk a spermából, és a Kovács-Foot-féle festéssel megfestettük, majd tárgylemezenként kétszáz spermium vitalitását és akroszómájának integritását állapítottuk meg.

A beavatkozások közül a centrifugálás és a fagyasztás okozta a legnagyobb spermiumpusztulást. A hígítások őszelel nem, de nyáron kedvezőtlenül befolyásolták a spermatozoák életképességét; a különbség nem szignifikáns. Az első hígítások utáni inkubációk mindegyike pozitívan hatott a termékenyítő anyag minőségére mind őszelel, mind nyáron.

A következő kísérletünk a fázisvizsgálat eredményeire épült, miszerint a hígítás utáni hosszabb ekvibrálatás kedvező hatást gyakorol a spermiumok életképességére. Ezért megnöveltük a fagyasztás előtti első hígítást követő inkubációs idő hosszát egy órával.

A hosszabb ideig tartó ekvibrálatás kedvezően hatott a spermiumok életképességére. Az élő, ép akroszómájú és motilis spermiumok aránya a hosszabb pihentetést követően szignifikánsan magasabbnak bizonyult a kontrollhoz képest. Kísérleteinkben a hosszabb pihentetés a spermiumok mozgási képességében is szignifikáns változást eredményezett. Azonban nem találtunk szignifikáns különbséget a nyáron és az őszelel levett minták eredményei között. A kétféle fagyasztási eljárás eredményeként létrejött termékenyítési anyagokat folyékony nitrogénben tároljuk, és a jövőben termékenyítéseket tervezünk végezni, hogy ellenőrizzük a két hűtési eljárás alkalmasságát. Amennyiben a hosszabb pihentetéssel fagyasztott-felolvasztott termékenyítő anyaggal sikeresebb termékenyülési eredmények születnek, úgy a fagyasztást megelőző hosszabb ekvibrálatás alkalmazásával biztosabb eredményt érhetnénk el.

A sperma fagyasztása és visszaolvasztása után is számos spermakezelési eljárás alkalmazható. Vizsgálatunkban a rövid idejű centrifugálás (10 perc, 200g-n), a felúsztatás (Sperm TALP médiumon keresztül) és a Percoll grádiens centrifugálás hatásait értékeltük, összehasonlítva a kanspermára gyakorolt hatásukat. Mindhárom IVF-nél alkalmazott beavatkozás sikerrel alkalmazható sertés faj esetében is. Bármely kezelést is alkalmazva a hímivarsejtek százalékos arányai magasabb értékeket mutattak. Leghatékonyabbnak a Percoll grádiens centrifugálás bizonyult. Az eredmények statisztikai értékelése azt jelezte, hogy a kontroll és a kezelt csoportok közti különbségek a beavatkozásoknak tulajdoníthatóak.

SUMMARY

In boar-breeding, the in vitro fertilization (IVF) is also getting a larger and larger scope, for which frozen semen could be transported even from hundreds of kilometres.

On the one hand, only those male boars are involved into the IVF system whose sperms are of adequate quality, while on the other hand, the weak points of the various processing techniques (sperm-collecting, diluting, congealing and storing technologies) have to be identified.

To make all these clear, there have been propounded numerous methods for assessing sperm viability all over the world.

As the first step of our series of experiments, we compared two methods for assessing sperm viability in the course of short-period boar semen storage with the purpose of revealing the extent of regular sperm perdition occurring during storage. We took boar semen from four breeds of Hungarian large boars which we stored for seven days at the temperature of 17 degrees Celsius. We took samples and smeared them on slides applying both the staining worked out by Kovács and Foote (1992) and the florescent staining by Harrison and Vickers (1990), and tested the quality of sperms daily as well.

These two types of staining procedures used in the short-period storage experiment showed that the proportion of live sperms with normal acrosomes was gradually declining with the days advancing correlating with the increase in the number of dead cells. The implementation of the staining by Kovács-Foote is simple, does not require any special laboratory conditions. We managed not only to get a detailed picture of the sperms' viability together with the integrity of their acrosomes membrane integrity, but also to establish the motility of sperms considering the tail staining.

The aim of our phase-examinations was to elucidate what influence the various pre-freezing sperm treatment methods and the deep-freezing itself can

have on the sperms' viability and to set the weak points of the treatment. To find out the possible seasonal discrepancies, the experiment was conducted in summer and autumn as well. We collected sperms from 7 boars which we froze after preparative treatment. After certain stages of the process – on 10 occasions altogether – we retained samples of the sperms and stained them with the method by Kovács-Foote in order to verify 200 sperms' viability and their acrosomes integrity on each slide.

Out of the different treatments, the centrifugation and the freezing caused the most devastation. The dilutions not in autumn but in summer influenced negatively the viability of the spermatozoa – the discrepancy, however, was not significant. After the first dilutions, each incubation had positive effects on the quality of the semen both in autumn and in summer.

The subsequent experiment was based on the results of the phase-examination, according to which the post-dilution incubation affects favourably the viability of sperms. For this reason, we increased the pre-freezing incubation period by one hour after the first dilution.

The longer-lasting incubation was advantageous of the viability of the sperms. After the longer incubation, the proportion of the live sperms with normal acrosomes and motile sperms proved to be significantly higher compared with the control ones. In our experiments, the longer incubation resulted in a significant change in the motility of sperms, as well. We could find no significant difference between the results of the samples taken in summer or in autumn. The semen got as the result of the two types of freezing procedures has been stored in liquid-form nitrogen, and in the future we are planning to perform fertilization to check the suitability of the two freezing processes. As long as more successful fertilization results are achieved with the longer incubated frozen-thawed semen, better results might be obtained by applying longer incubation before freezing.

Even after freezing and thawing of sperms, there are several sperm treatment methods available. In our examinations, we evaluated the effects of short-time centrifugation (10min, at 200 gravitational accelerations), the swim up through sperm TALP medium and the Percoll gradients centrifugation, compared with their effects on boar semen. All three treatments applied at IVF can also be used successfully for species of boars. Applying any of the treatments, the percentage of spermatozoa reached higher figures. The Percoll gradients centrifugation seemed to be the most effective. The statistical analysis of the results indicated that the discrepancies between the control and the treated groups were due to the treatments.

IRODALOMJEGYZÉK

Abeydeera L.R.: In vitro fertilization and embryo development in pigs. *Reprod.* 2001, 58, 159-173.

Akerlof E., Fredrickson B., Gustafsson O., Lundin A., Lunell N.O., Nylund L., Rosenborg L., Pousette A.: Comparison between a swim up and a Percoll gradient technique for the separation of human spermatozoa. *Int. J. Androl.* 1987, 10, 663-669.

Almid T., Clarke R.N., Pursel V.G., Johnson L.A.: Effectiveness of in vitro methods for predicting in vivo fertilizing capacity of boar spermatozoa cryopreserved with 2% or 4% glycerol. *Zuchthyg.* 1989, 24, 8-15.

Almid T., Hofmo P.O.: A brief review of frozen semen application under Norwegian AI service conditions. *Reprod. Dom. Anim.* 1996, 5, 117-125.

Almid T., Johnson L.A.: Effects of glycerol concentrations, equilibration time and temperature of glycerol addition on post thaw motility of boar spermatozoa frozen in straws. *J. Anim. Sci.* 1988, 66, 2899-2905.

Althouse GC, Hopkins SM. Assessment of boar sperm viability using a combination of two fluorophores. *Therio.* 1995, 43, 595–603.

Amann R.P., Pickett B.W.: Principles of cryopreservation and a review of cryopreservation of stallion spermatozoa. *J. Equine Vet. Sci* 1987, 7, 145-173.

Austin C.R. : The „capacitation” of the mammalian sperm. *Nature London*, 1951, 170, 326-330.

Bader H.: Untersuchungen über den Einfluss unterschiedlicher Abkühlungszeiten beim Tiefgefrieren von Ebersperma auf die Bewegungsaktivität der Samenzellen. Thesis. Tierärztliche Hochschule, Hannover, 1964.

Baier W.: Erfahrungen in der künstlichen Besamung des Hausschweines einschließlich der Verwendung von Tiefkühlsamen. *Zootec. Vet.* 1962, 17, 94-99.

Bali Papp Á., Nagy Sz., Iváncsics J., Kovács A., Pécsi T., Dohy J.: Comparison of viability and acrosome status of boar spermatozoa frozen on mini or maxi straws – 50th Annual Meeting of EAAP, 1999, 22-26 August, Zurich, Switzerland, 126.

Bali Papp Á., Varga E., Kiss V.: Sertés embriók mélyhűtésének lehetőségei. *Állatteny. és Tak.* 2004, 53, 167-168.

Bali Papp Á., Somfai T., Tartaglione M., Varga E., Gardon J.C.: The effect of nerve growth factor on nuclear progression of porcine oocytes during in vitro maturation and embryo development. *Acta Vet. Hung.* 2005, 53, 91-101.

Bali Papp Á., Varga E.: Chemical activation of in vitro matured porcine oocytes. *Reprod. Fertil. Dev.* 2006, 18, 263-264.

Bamba K., Cran D.G.: Effect of rapid warming of boar semen on sperm morphology and physiology. *J. Reprod. Fert.* 1985, 75, 133-138.

Bamba K., Cran D.G.: The effect of rapid warming of bull and rabbit semen. *J. Reprod. Fert.* 1986, 82, 501-507.

Bamba, K., Cran, D.G.: Effects of treatment with butylated hydroxytoluene on the susceptibility of boar spermatozoa to cold stress and dilution. *J. Reprod. Fertil.*, 1992, 95, 69—77.

Bamba K., Taniguchi T., Kojima J., Iida I.: Studies on the deep freezing of boar semen. VI. Effects of rapid freezing on survival of boar spermatozoa. *Jap. J. Anim. Reprod.* 1968.

Barboni B., Mattioli M., Seren E.: Influence of progesterone on boar sperm capacitation. *J. Endocrin.* 1995, 144, 13-18.

Becze J.: A nőivarú állatok szaporodásbiológiája. Mezőgazdasági Kiadó, Budapest, 1991.

Bedford J.M.: Significance of the need for sperm capacitation before fertilization in eutherian mammals. *Biol. Reprod.* 1983, 28, 108-102.

Benson, R.W., Pickett, B.W., Komarek, R.J., Lucas, J.J.: Effect of incubation and cold shock on motility of boar spermatozoa and their relationship to lipid content. *J. Anim. Sci.*, 1967, 26, 1078—1081.

Berger B., Fischerleitner F.: On deep freezing of boar semen: investigation on the effects of different straw volumes, methods of freezing and thawing extenders, *Reprod. Dom. Anim.* 1992, 27, 266-270.

Blom E.: A one-minute live-dead stain by means of eosin-nigrosin. *Fertil. Steril.*, 1950, 1. 176-177.

Brandies V.T., Manuel M.T.: Effect of four methods of sperm preparation on the motile concentration, morphology and acrosome status of recovered sperm from normal semen samples. *J. Assist. Reprod. Genet.* 1993, 10, 409-416.

Buhr M.M., Iser P., Bailey J.L., Curtis E.F.: Cryopreservation in different concentration of glycerol alters boar sperm and their membranes. *J. Androl* 2001, 22, 961-969.

Bwanga C.O., de Braganca M.M., Einarsson S., Rodriguez-Martinez H.: Cryopreservation of boar semen in Mini- and Maxi-straws, *J. Vet. Med. A.* 1990, 37, (9), 651-658.

Canvin A.T., Buhr M.M.: Effect of temperature on the fluidity of boar spermatozoa membranes. *J. Reprod. Fert.*, 1989, 85. 533-540.

Chacarov E.L., Mollova M.V.: A one-act differential stain of the acrosome with active dyes. *J. Reprod. Fert.* 1976, 48, 245-246.

Chan S.Y., Chan Y.M., Tucker M.J.: Comparison of characteristics of human spermatozoa selected by the multiple tube swim-up and simple discontinuous Percoll gradient centrifugation. *Androl.* 1991, 23, 213-218.

Check J.H., Katsoff D., Kozak J., Lurie D.: Effect of swim-up, Percoll and Sephadex sperm separation methods on the hypo-osmotic swelling test. *Hum. Reprod.* 1992, 109-111.

Cöster C.G.E.: Tiefgefrierkonservierung von Ebersperma in Kunststoffrohren. In vitro Untersuchungen zur Verfahrensverbesserung sowie Besamungsergebnisse nach Anwendung unterschiedlicher Inseminationsmediem und Techniken. Thesis. Tierärztliche Hochschule, Hannover, 1978.

Crabo B.G., Einarsson S.: Fertility of deep frozen boar semen. *Acta. Vet. Scand.* 1971, 12, 125-127.

Crabo B.G., Einarsson S., Lamm Á.M., Soosalu O., Viring S.: Studies on the fertility of deep frozen boar spermatozoa. *Proc. VIIth Int. Congr. Anim. Reprod. & A.I.*, Munich, 1972a, 2, 1647-1652.

Crabo B.G., Graham W.F., Larson E.V.: The influence of thawing methods on frozen boar spermatozoa. *Cryobiology* 1972b, 9, 331.

Cross N.L., Meizel S.: Methods for evaluating the acrosomal status of mammalian sperm. *Biol. Reprod.* 1989, 41, 635-641.

Dalrymple J.R., Macpherson J.W.: Low temperature preservation of boar spermatozoa. *Can. J. Anim. Sci.* 1969, 49, 45-49.

De Mott R.P., Suarez S.S.: Hyperactivated sperm progress in the mouse oviduct. *Biol. Reprod.* 1992, 46, 779-785.

Devries A.C., Colenbrander B.: Isolation and characterisation of boar spermatozoa with and without a cytoplasmic droplet. *Int. J. Biochem.* 1990, 22, 519-524.

Drevious L.O.: The 'sperm-rise' test. *J. Reprod. Fertil.* 1972, 24, 427-432.

Dukelow W.R., Graham E.F.: Freezing of porcine semen. *J. Anim. Sci.* 1962, 21, 1020-1021 (Abstr).

Einarsson S.: Studies on the composition of epididymal content and semen in the boar, *Acta Vet. Scand.* 1971, Suppl. 36.

Einarsson S.: Deep freezing of boar spermatozoa. *World. Rev. Anim. Prod.* 1973, IX, 45-51.

Einarsson S., Soosalu O., Swensson T., Viring S.: On the fertility and survival of deep frozen boar spermatozoa thawed in skim milk. *Acta. Vet. Scand.* 1972, 13, 446-448.

Einarsson S., Swensson T., Viring S.: A field trial on the fertility of deep frozen boar spermatozoa. *Nord. Vet. Med.* 1973, 25, 372-376.

Englert Y., Van der Bergh M., Rodesch C., Bertrand E., Biramane J., Legreve A.: Comparative auto-controlled study between swim-up and Percoll preparation of fresh semen samples for in vitro fertilization. *Hum. Reprod.* 1992, 7, 399-402.

Eriksson B.M., Rodriguez-Martinez H.: Effect of freezing and thawing rates on the post-thaw viability of boar spermatozoa frozen in FlatPacks and Maxi-straws, *Anim. Reprod. Sci.* 2000, 63, 205-220.

Eriksson BM, Vazquez JM, Martinez EA, Roca J, Lucas X, Rodriguez-Martinez H. Effects of holding time during cooling and of type of package on plasma membrane integrity, motility and in vitro oocyte penetration ability of frozen-thawed boar spermatozoa. *Therio.* 2001, 55, 1593–605.

Eriksson B. M., Petersson H., Rodriguez-Martinez H.: Field fertility with exported boar semen freezing into the new FlatPack container, *Therio.* 2002; 58, 1065-1079.

Evenson D.P., Darzynkiewicz Z., Melamed M.R.: Simultaneous measurement by flow cytometry of sperm cell viability and mitochondrial membrane potential related to cell motility. *J. Histochem. Cytochem.* 1982, 30, 279-280.

Ewert L.: Experiments on preparation of boar spermatozoa for cryoconservation in straws and biological-physical aspects of thawing by microwaves. Thesis, School of Vet. Med., Hannover, 1988, 91 pp.

Fiser P.S., Fairfull R.W.: Combined effect of glycerol concentration and cooling velocity on motility and acrosomal integrity of boar spermatozoa frozen in 0.5ml straws. *Mol. Reprod. Dev.* 1990, 25, 123-129.

Fiser P.S., Fairfull R.W., Hansen C, Panich P.L., Shrestha J.N.B., Underhill L.: The effect of warming velocity on motility and acrosomal integrity of boar sperm as influenced by the rate of freezing and glycerol level. *Mol. Reprod. Dev.* 1993, 34, 190-195.

Flowers W.L.: Management of boars for efficient semen production. *J. Reprod. Fert. Suppl.* 1997, 52. 67-78.

Funahashi H., Day B.N.: Effects of the duration of exposure to supplemental hormones on cytoplasmic maturation on pig oocytes in vitro. *J. Reprod. Fertil.* 1993, 98, 179.

Gadea J., Matas C.: Sperm factors related to in vitro penetration of porcine oocytes. *Therio.* 2000, 54. 1343-1357.

Gadea J., Sellés E., Marco M.A., Coy P., Matás C., Romar R., Ruiz S.: Decrease in glutathione content in boar sperm after cryopreservation. Effect of the addition of reduced glutathione to the freezing and thawing extenders. *Therio.* 2004, 62, 690-701.

Gadella B.M., Harrison R.A.P.: Capacitation induced cyclic adenosin 3', 5'-monophosphate dependent, but apoptosis unrelated, exposure of aminophospholipids at the apical head plasma membrane of boar sperm cells, *Biol. Reprod.* 2002, 67, 340-50.

Garner D.L., Pinkel D., Johnson L.A., Pace M.M.: Assessment of spermatozoal function using dual fluorescent staining and flow cytometric analyses. *Biol. Reprod.* 1986, 34, 127-138.

Garner D.L., Thomas C.A., Joerg H.W., DeJarnette J.M., Marchall C.E.: Fluorometric assessment of mitochondrial function and viability in cryopreserved bovin spermatozoa. *Biol. Reprod.* 1997, 57, 1401-1406.

Gillan L., Evans G., Maxwell W.M.C.: Capacitation status and fertility of fresh and frozen-thawed ram spermatozoa. *Reprod. Fert. Dev.* 1997, 9, 481-487.

Golyshev N.A: Improvement of freezing technology of boar semen. *Zhivotnovodstvo*, 1985, 7. 49—51.

Graham J.K., Hammerstedt R.H.: Differential effects of butylated hydroxytoluene analogs on bull sperm subjected to cool-induced membrane stress. *Cryobiology*, 1992, 29. 106-107.

Graham E.F., Rajamannan A.H.J., Schmehl M.K.L., Maki-Laurila M., Bower R.E.: Preliminary report on procedure and rationalize for freezing boar spermatozoa. *A.I. Digest*, 1971a, 19, 12-14.

Graham E.F., Rajamannan A.H.J., Schmehl M.K.L., Maki-Laurila M., Bower R.E.: Fertility studies with frozen boar spermatozoa. *A.I. Digest* 1971b, 19, 16-18.

Graham E.F., Crabo B.G.: Some factors influencing the freezing of boar spermatozoa. *Proc. VIIth Int. Congr. Anim. Reprod. & A.I.*, Munich, 1972, 2, 1627-1632.

Hancock J.L. (1952) Cit: Watson P.F.: Use of a Giemsa stain to detect changes in acrosomes of frozen ram spermatozoa. *Vet. Rec.*, 1975, 97, 12-15.

Harrison R.A.P, Vickers S.E: Use of fluorescent probes to assess membrane integrity in mammalian spermatozoa. *J. Reprod. Fert.* 1990, 88, 343-352.

Hernandez M., Roca J., Ballester J., Vazquez J.M., Martinez E.A., Johannisson A, et al.: Differences in SCSA outcome among boars with different sperm freezability. *Int. J. Androl.* 2006, 29, 583-591.

Hernandez M., Roca ., Gil M.A., Vazquez J.M., Martinez E.A.: Adjustments on the cryopreservation conditions reduce the incidence of boar ejaculates with poor sperm freezability. *Therio.* 2007, 67, 1436-1445.

Herrera J., Fiero R., Zayas H., Conejo J., Garcia A., Betancourt M.: Acrosome reaction infertile and subfertile boar sperm, *Arch. Androl.* 2002, 48, 133-9.

Hess E.A., Ludwick T.M., Teague H.S.: Motility of boar spermatozoa as influenced by semen freezing procedure. *J. Anim. Sci.* 1960, 19, 926-931.

Hoffmann, H.H.: Versuche zur Frostkonservierung des Ebersamens. Thesis. Tierärztliche Hochschule, München, 1959.

Huo L. J., Ma X. H., Yang Z. M.: Assessment of sperm viability, mitochondrial activity, capacitation and acrosome intactness in extended boar semen during long-term storage, *Therio.* 2002, 58, 1349-60.

Iida I., Adachi T.: Studies on deep freezing of boar sernen. I. Effects of various diluents, glycerol levels and glycerol equilibration periods on deep freezing of boar spermatozoa. *Jap. J. Zootec. Sci.* 1966, 37, 411-416.

Ivanova M., Mollova M.: Zona-penetration in vitro test for evaluating boar sperm fertility. *Therio.* 1993 40. 391-410.

Jeyendran R.S., Van der Ven H.H., Perez-Pelaez M., Crabo B.G., Zaveneld L.J.D.: Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship of other semen characteristics. *J. Reprod. Fert.*, 1984, 70, 219-228.

Johnson L.A.: Current developments in swine semen: preservation, artificial insemination and sperm sexing. *Proc. 15th Int. Pig Vet. Soc. Congress Vol 1*, 1998, 225-229.

Johnson L.A., Weitze K.F., Fiser P., Maxwell W.M.C.: Storage of boar semen. *Anim. Reprod. Sci.*, 2000, 62, 143-172.

Juonala, T., Lintukangas, S., Nurttila, T., Andersson, M.: Relationship between semen quality and fertility in 106 AI-boars. *Reprod. Dom. Anim.*, 1998, 33. 155-158.

King G.J., Macpherson J.W.: Boar semen studies. I. Laboratory evaluation of processing phases. *Can. J. Comp. Med.* 1966, 30, 12.

King G.J., Macpherson J.W.: Boar semen studies. II. Laboratory and fertility of a method for deep freezing. *Can. J. Comp. Med.* 1967, 31, 46.

Koehler, J.K.: Mammalian sperm membranes: Their mosaic form and differential sensitivities. In: *Deep freezing of boar semen.* (Ed: Johnson, L. A. – Larsson, K.) Uppsala, Sweden, 1985.37-60.

Kojima Y., Iida I., Bamba K., Kobayashi S.: Studies on deep freezing of boar semen. Additional effects of DMSO as a cryoprotective agent. *Japan J. Anim. Reprod.* 1967, 13, 149-155.

Kovács A., Foote R.H.: Viability and acrosome staining of bull, boar and rabbit spermatozoa. *Biot. Histoc.* 1992, 67, 119-124.

Larson E.V., Graham E.F.: Measurements of cooling rates and cell survival different points within a sphere. *Cryobiology* 1973, 10, 515.

Larson J.L., Miller D.J.: Simple histochemical stain for acrosomes on sperm from several species. *Mol. Reprod. Dev.* 1999, 52, 445-449.

Larsson K., Einarsson S.: Fertility of deep frozen boar spermatozoa. Influence of thawing diluents and of boars. *Acta Vet. scand.* 1976a, 17, 43-62.

Larsson, K., Einarsson, S.: Influence of boars on the relationship between fertility and post-thawing sperm quality of deep frozen boar spermatozoa. *Acta Vet Scand.*, 1976b 17. 74–82.

Larsson K., Einarsson S., Swensson T.: The development of a practicable method for freezing of boar spermatozoa. *Nord. Vet. Med.* 1977, 29, 113-118.

Larsson, K.: Boar sperm viability after freezing and thawing. *Proc 1st Int. Conf. Deep Freezing of Boar Semen*, 1985, Uppsala. pp. 177-187.

Lasley J.F., Easley G.T., McKenzie F.F.: A staining method for the differentiation of live and dead spermatozoa. I. Applicability to the staining of ram spermatozoa. *Anat. Rec.*, 1942, 82, 167-173.

Lopata A., Patullo M.J., Chang A., James B.: A method for collecting motile spermatozoa from human semen. *Fertil. Steril.* 1976, 27, 677-684.

Mantegazza P.: Sullo sperma umano. *Rc. Inst. Lomb. Sci. Lett.* 1866, 13, 183-196. Cited by Watson P.F. (1979)

Martinez E., Vazquez J.M., Matas C., Roca J., Coy P., Gadea J.: Evaluation of boar spermatozoa penetrating capacity using pig oocytes at the germinal vesicle stage. *Therio.* 1993, 40, 547.

Mattioli M., Barboni B.: Induction of oocyte maturation. In: *Gametes. Development and function* (Eds: A. Lauria, E. Gandolfi, G. Enne, L. Gianaroli 1998, 141-153.

Mátyus L., Szabó G. Jr., Resli I., Gáspár R. Jr., Damjanovich S.: Flow cytometric analysis of viability of bull sperm cells. *Acta Biochim. Biophys. Hung.* 1984, 19, 209-214.

Mazur P: The role of intracellular freezing in the death of cells cooled at supraoptimal rates. *Cryobiology* 1977, 14, 251-272.

Mazur P.: Basic concepts in freezing cells. In: *Deep freezing of boar semen.* (Ed. Johnson L. A., Larsson K.) *Swedish Univ. Agric. Sci.*, Uppsala, 1985, 91-111.

Medrano A., Watson P.F., Holt W.V.: Importance of cooling rate and animal variability for boar sperm cryopreservation: insights from the cryomicroscope. *Reprod.* 2002, 123, 315-322.

Menkveld R., Swanson R.J., Kotze T.J., Kruger T.F.: Comparison of a discontinuous Percoll gradient method versus a swim-up method: effects on sperm morphology and other semen parameters. *Androl.* 1990, 22, 162-158.

Mermillod P., Massip A., Dessy F.: In vitro production of cattle embryos: review and Belgian results. *Int. J. Dev. Biol.* 1992, 36, 185-195.

Miyazaki R., Fukuda M., Takeuchi H., Itoh S., Takada M.: Flow cytometry to evaluate acrosome-reacted sperm. *Arch. Androl.* 1990, 25, 243-251.

Morales P., Vantman D., Barros C., Vigil P.: Human spermatozoa selected by Percoll gradient or swim-up are equally capable of binding to the human zona pellucida and undergoing the acrosome reaction. *Hum. Reprod.* 1991, 6, 401-404.

Nagai T.: In vitro maturation and fertilization of pig oocytes. *Anim. Reprod. Sci.* 1996, 42, 153-163.

Nagase H., Niwa T.: Studies of the deep freezing technique for bull semen. III. Deep freezing of bull semen in pellet form. *Japan J. Anim. Reprod.* 1963, 9, 73-77.

Nagy Sz., Házás G., Bali Papp Á., Kovács A., Iváncsics J.: Stained sperm tails: dead or alive? 1st Int. Conf. Assoc. Applied Animal Andrology, Herceghalom, Hungary, 23-24 November 1998.

Nagy Sz., Házás G., Bali Papp Á., Iváncsics J., Szász F., Szász F. Jr., Kovács A., Foote R.H.: Evaluation of sperm tail membrane integrity by light microscopy. *Therio.* 1999, 52, 1153-1159.

Nagy Sz.: Emlős spermiumok membránintegritás-vizsgálatai. *Állattenyésztés és Takarmányozás*, 2002, 51, 607-616.

Nagy Sz., Hallap T., Johannisson A., Rodriguez-Martinez H.: Changes in plasma membrane and acrosome integrity of frozen-thawed bovine spermatozoa during a 4 h incubation as measured by multicolor flow cytometry. *Anim. Reprod. Sci.*, 2004, 80, 225-235.

Oettlé E.E.: Using a new acrosome stain to evaluate sperm morphology. *Food Animal Practice*, 1986, 263-266.

Osinowo O., Salamon S.: Examination of some processing methods for freezing boar semen. *Aust. J. Biol. Sci.* 1976, 29, 325-333.

Paquignon M., Courot M.: Fertilizing capacity of frozen boar spermatozoa. Proc. VIIIth Int. Congr. Anim. Reprod. & A.I., Cracow, 1976, 4, 1041-1044.

Paquignon M, du Mesnil du Buisson F.: Fertilité et prolificité de truies inséminées avec du sperme congelé. Comparaison de deux dilués. J. Rech. Porcine en France 1973, 49-57.

Park H.K., Kim S.H., Kim K.J., Choi K.M.: Studies on the frozen boar semen. I. Studies on the development of diluents for freezing of boar semen. Korean J. Anim. Sci. 1977, 19, 260-266.

Parrish J.J., Susco-Parrish J.L., Leibfried-Rutledge M.L., Critser E.S., Eyestone W.H., First N.L.: Bovine in vitro fertilization with frozen-thawed semen. Therio. 1986, 25, 591-600.

Parrish J.J., Vredenburg W.L., Larin C.A.: Increases in bovine sperm intracellular calcium (Ca) and pH (PHi) during capacitation. Biol. Reprod. 1993, 48, 106.

Paulenz, H., Drevle, I.S., Andersen, Berg K., Thomassen, R.: The use of a dichromatic stain method (Spermac) for determining changes in the acrosomal integrity of boar semen during cryopreservation. Reprod. Dom. Anim. 1995, 30, 113-116.

Pavelko M.K., Crabo B.G.: Possible importance of some sperm coating proteins and their behaviour during preservation of boar spermatozoa. Proc. VIIIth Int. Congr. Anim. Reprod. & A.I., Cracow, 1976, 4, 1045-1048.

Polge C., Salamon S., Wilmut I.: Fertilizing capacity of frozen boar semen following surgical insemination Vet. Rec. 1970, 87, 424-428.

Polge C., Smith A.U., Parkes A.S.: Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperature. Nature 1949, 164, 666.

Polge C.: Artificial Insemination in Pigs. Vet. Rec. 1956, 68, 62-76.

Polge C.: The fertilizing capacity of boar spermatozoa following freezing and thawing. Proc. VIIIth Int. Congr. Anim. Reprod. & A.I, Cracow, 1976, 4, 1061-1064.

Pontbriand, D., Howard J.G., Schiewe M.C., Stuart L.D., Wildt D.E.: Effect of cryoprotective diluent and method of freeze-thawing on survival and acrosomal integrity of ram spermatozoa. Cryobiology 1989, 26, 341-354.

Punjabi U., Gerris J., Van Bijlen J., Delbeke L., Gielis M., Buytaert P.: Comparison between different pre-treatment techniques for sperm recovery prior to intrauterine insemination, GIFT or IVF. Hum. Reprod. 1990, 5, 75-83.

Pursel V.G., Johnson L.A.: Procedures for the preservation of boar spermatozoa by freezing. U.S. Dept. Agric. 1971a, 44, 227.

Pursel V.G., Johnson L.A.: Fertilizing capacity of frozen boar spermatozoa. J. Anim. Sci. 1971b, 33, 1162.

Pursel V.G., Johnson L.A., Schulman L.L.: Interaction of extender composition and incubation period on cold shock susceptibility of boar spermatozoa. J. Anim. Sci. 1972, 35, 580-584.

Pursel V.G., Johnson S.A., Shulman L.L.: Effect of dilution, seminal plasma and incubation period on cold shock susceptibility of boar spermatozoa. J. Anim. Sci., 1973, 37. 532—535.

Pursel V.G., Johnson L.A.: Freezing of boar spermatozoa. Fertilizing capacity with concentrated semen and a new thawing procedure. J. Anim. Sci. 1975, 40, 99-102.

Pursel V.G., Johnson L.A.: Frozen boar spermatozoa: Methods of thawing pellets. J. Anim. Sci. 1976, 42, 927-931.

Pursel V.G., Schulman L.L., Johnson L.A.: Effect of Orvus ES Paste on acrosome morphology, motility and fertilizing capacity of frozen—thawed boar sperm. J. Anim. Sci., 1978 7. 198—202.

Pursel V.G., Parks C.S.: Freezing and thawing procedures for boar spermatozoa. In: L.A. Johnson, K. Larsson. eds. "Deep Freezing of Boar Semen." Uppsala, Sweden. Swedish University of Agricultural Science, 1985, 147-166.

Rauhaus H.: Untersuchungen zur Morphologie und Lebend-Tot-Färbung von Spermien einiger Haustierarten. Inaugural-Dissertation, München, 1990.

Richter L., Liedicke A.: Method of deep freezing of boar semen. Proc. VIIIth Int. Congr. Anim. Reprod. & A.I. Munich, 1972, 2, 1617-1621.

Richter L., Romeny E., Weitze K.F., Zimmermann F.: Zur Tiefgefrierung von Ebersperma. 7. Mitteilung: Weitere labor- und Besamungsversuche mit dem Verdünner Hülsenberg VIII. Dtsch. Tierärztl. Wschr. 1975, 82 (4), 155-162.

Roca J, Carvajal G, Lucas X, Va'zquez JM, Mart'inez EA. Fertility of weaned sows after deep intrauterine insemination with a reduced number of frozen-thawed spermatozoa. Therio. 2003, 60, 77-87.

Rodriguez-Martinez H., Ericsson B., Lundeheim I.: Freezing boar semen in flat plastic bags. Membrane integrity and fertility. In: Rath D., Johnson L. A., Weitze K. F. (Eds), Boar Semen Preservation III. Proc. 3rd Int. Conf. Deep Freezing Boar Semen. Reprod. Dom. Anim. 31 Blackwell, Berlin, 1996, 161-168, (Suppl.1)

Rohloff D.: Tiefgefrierung von Ebersperma in pelletform bei -196°C. Zuchtyg. 1967, 2, 75-77.

Rosenkranz C.H., Holzmann A.: The effect of sperm preparation on the timing of penetration in bovine in vitro fertilization. Anim. Reprod. Sci. 1997, 46, 47-53.

Salamon S., Visser D.: Insemination with frozen boar semen. Proc. VIIth Int Congr. Anim. Reprod. & A.I. Munich, 1972, 2, 1645-1646.

Salamon S., Visser D.: Fertility test of frozen boar spermatozoa. Aust. J. Biol. Sci. 1973, 26, 291-293.

Salamon S., Wilmut I., Polge C.: Deep freezing of boar semen. I. Effects of diluent composition, protective agents and method of thawing on survival of spermatozoa. Aust. J. Biol. Sci. 1973, 26, 219-230.

Sapienza F., Verheyen G., Tournaye H., Janssens R., Pletincx I., Derde M., Van Steirteghem A.: An auto-controlled study in in vitro fertilization reveals the benefit of Percoll centrifugation to swim-up in the preparation of poor quality semen. Hum. Reprod. 1993, 8, 1856-1862.

Saravia F, Wallgren M, Nagy S, Johannisson A, Rodriguez-Martinez H. Deep freezing of concentrated boar semen for intrauterine insemination: effects on sperm viability. *Therio.* 2005, 63, 1320–33.

Sarhaddi F., Iváncsics J., Farkas Á.: Evaluation of the effect of sedimentation magnetic field on acrosome status of ram spermatozoa. *Acta Agronomica Óváriensis* 1995, 37, (2) 185-191.

Serdiuk S.I.: Artificial insemination of pigs, (in Russian), Kolos, Moscow, 1970, 144 pp.

Settergren I: Experiments on the Deep-freezing of Boar Semen at -79 C. *Proc. VIIIth Nord. Vet. Congr. Helsingfors*, 1958, 705-707.

Shaffer H.E., Almquist J.O.: Vital staining of bovine spermatozoa with an eosin-aniline blue staining mixture. *J. Dairy Sci.*, 1948, 31, 677-678.

Shamsuddin M., Rodriguez-Martinez H.: A simple, nontraumatic method for the selection of spermatozoa for in vitro fertilization in the bovine. *Anim. Reprod. Sci.* 1994, 36, 61-75.

Shapiev I.S.H., Moroz L.G., Korban I.V.: Technology of freezing boar semen, (in Russian), *Zhivotnovodstvo* 1976, 12, 60-62.

Simmet C.: Kältephysikalische Aspekte der Gefrierkonservierung von Ebersperma in ihrer Auswirkung auf Samenqualität und Befruchtungsrate, Thesis, 1993, Hannover Veterinary College

Sirard, M.A., Dubuc A., Bolamba, D., Zheng, Y., Coenen, K.: Follicle – oocyte – sperm interactions in vivo and in vitro in pigs. *J. Reprod. Fert. Suppl.* 1993, 48. 3-16.

Somfai T., Bodó Sz., Nagy Sz., Bali Papp Á., Iváncsics J., Baranyai B., Gócza E., Kovács A.: Effect of swim up and Percoll treatment on viability and acrosome integrity of frozen-thawed bull spermatozoa. *Reprod. Dom. Anim.* 2002, 37, 285-290.

Somfai T, Kikuchi K., Onishi A., Iwamoto M., Fuchimoto D., Bali Papp Á., Sato E., Nagai T.: Effects of Invasine adenylat cyclase,3-isobutyl 1-methylxanthine

and dibutyryl cyclicAMP on IVM, IVF and IVC of porcine oocytes. *Therio.* 2003, 59, 498

Somfai T., Kikuchi K., Onishi A., Iwamoto M., Fuchimoto D., Bali Papp Á, Sato E., Nagai T.: Relationship between the morphological changes of somatic compartment and the kinetics of nuclear and cytoplasmatic maturation of oocytes during in vitro maturation of porcine follicular oocytes. *Molec. Reprod and Dev.* 2004, 68, 484-491.

Somfai T., Kikuchi K., Medvedev S.Y., Onishi A., Iwamoto M., Fuchimoto D., Ozava M., Noguchi J., Kaneko H., Bali Papp Á., Sato E., Nagai T.: In vitro development of immature porcine oocytes fertilized in vitro to the blastocyst stage. *Reprod. Fert. and Dev.* 2005, 17, 300

Spallanzani L.: Opuscoli di fisca animale e vegetabile. Opuscolo II. Osservazioni e sperienze intorno ai vermicelli spermatici dell' homo e degli animali. *Moderna* 1776. Cited by Watson PF 1979, in this reference list.

Sterzik K., De Santo M., Uhlich S., Gagsteiger F., Stehler E.: Glass wool filtration leads to a higher percentage of spermatozoa with intact acrosomes: an ultrastructural analysis. *Hum. Reprod.* 1998, 13, 2506-2511.

Strzezek J., Glogowski J., Magierka E., Lubera Z., Jabbonosvska C.: Some aspects of cryobiochemistry of boar semen. *Proc. 10th Int. Congr. Anim. Reprod. A.I., Urbana, IL* 1984, 2, 224.

Suzuki C., Yochioke K., Itoh S., Kawarasaki T., Kikuchi K.: In vitro fertilization and subsequent development of porcine oocytes using cryopreserved and liquid-stored spermatozoa from various boars, *Therio.* 2005, 64, 1287-1296.

Talbot P., Chacon R.S.: A triple-stain technique for evaluating normal acrosome reactions of human sperm. *J. Exp. Zool.* 1981, 215, 201-208.

Tuli R.K., Schmidt-Baulain R., Holtz W.: Computer-assisted motility assessment of spermatozoa from fresh and frozen-thawed semen of the bull, boar and goat. *Therio.* 1992, 38, 487-490.

Valcárcel A., de las Heras M.A., Moses D.F., Pérez L., Baldassare H.: Comparison between Sephadex G-10 and Percoll for preparation of normospermic, asthenospermic and frozen/thawed ram semen. *Anim. Reprod. Sci.* 1996, 41, 215-224.

Valcárcel A., de las Heras M.A., Pérez L., Moses D.F., Baldassare H.: Assessment of the acrosomal status of membrane-intact ram spermatozoa after freezing and thawing, by simultaneous lectin/Hoechst 33258 staining. *Anim. Reprod. Sci.* 1997, 45, 299-309.

van der Zwalm P., Bertin-Segal G., Geerts L., Debauche D., Schoysman R.: Sperm morphology and IVF pregnancy rate: comparison between Percoll gradient centrifugation and swim up procedures. *Hum. Reprod.* 1991, 6, 581-588.

Vazquez J.M., Martinez E., Roca J., Lucas X., Parrilla I., Gil M.A.: Metodos y estrategias en la evaluacion de espermatozoides criopreservados de verraco. In: *Proc. of II Congreso Iberico de Reproduccion Animal, 1999*, vol. 1. 377-81.

Verheyen G., Pletincx I., VanSteirteghem A.: Effect of freezing method, thawing temperature and post-thaw dilution/washing on motility (CASA) and morphology characteristics of high-quality human sperm. *Hum. Reprod.* 1993, 8, 1678-1684.

Vincente A.: Technology of freezing boar semen. In: *Proc. VIIth Int. Congr. Anim. Reprod. & A.I. Munich, 1972*, 2, 1623-1628.

Visser D, Salamon S.: Effect of composition of Tris-based diluent on survival of boar spermatozoa following deep freezing. *Aust. J. Biol. Sci.* 1974, 27, 485-497.

Wang W.H., Abeydeera L.R., Fraser L.R., Niwa K.: Functional analysis using chlortetracycline fluorescence and in vitro fertilization of frozen thawed ejaculated boar spermatozoa incubated in a protein-free chemically defined medium. *J. Reprod. Fertil.* 1995, 104, 305-313.

Watson P.F.: Use of a Giemsa stain to detect changes in acrosomes of frozen ram spermatozoa. *Vet. Rec.* 1975, 97, 12-15.

Watson P.F.: The Effects of cold shock on sperm cell membranes. In: Effects of Low Temperatures on Biological Membranes. Ed. Morris G.J., Ciarke A., Academic Press, London, 1981, 189-218.

Watson P.F.: The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. Anim. Reprod. Sci. 2000, 60, 481-492.

Weitze K.F., Rath D., Baron G.: Neue Aspekte der Tiefgefrierkonservierung von Ebersperma in Plastikröhren. Deutsch. Tierarzt. Wochenschr. 1987, 94, 485-488

Weitze K.F., Rath D., Leps H.: Influence of volume/surface ratio of plastic packages upon freeze-thaw rate and fertility of boar semen. Proc. 11th Int. Cong. Anim. Reprod. Insem., Dublin 1988, 3, 312.

Wells M.E., Awa O.A.: New technique for assessing acrosomal characteristics of spermatozoa. J. Dairy Sci., 1970, 53, 2, 227-232.

Westendorf P., Richter L., Treu H.: Zur Tiefgefrierung von Ebersperma Labor- und Besamungsergebnisse mit dem Hulsenberger Pailletten-Verfahren. Dtsch. Tierärztl. Wschr. 1975, 82, 261-267.

Wilmot I., Polge C.: The freezing of boar spermatozoa. Proc. VIIth Congr. Anim. Reprod. & A.I. Munich, 1972, 2, 1611-1615.

Wilmot I., Salamon S., Polge C.: Deep freezing of boar semen. II. Effects of method of dilution, glycerol concentration, and time of semen glycerol contact on survival of spermatozoa. Aust. J. Biol. Sci. 1973, 26, 231-237.

Wilmot I., Polge C.: The low temperature preservation of boar spermatozoa. I. The motility and morphology of boar spermatozoa frozen and thawed in the presence of permeating protective agents. Cryobiology 1977a, 14, 471-478.

Wilmot I., Polge C.: The low temperature preservation of boar spermatozoa. II. The motility and morphology of boar spermatozoa frozen and thawed in diluent which contained only sugar and egg yolk. Cryobiology 1977b, 14, 479-482.

Woelders, H.: Overview of in vitro methods for evaluation of semen quality. *Reprod. Dom. Anim.* 1990, Supp.1. 146-165.

Xu X., Ding J., Seth P. C., Harbison D.S., Foxcroft G.R.: In vitro fertilization of in vitro matured pig oocytes: effect of boar and ejaculated fraction, *Therio.* 1996, 46, 1325-1337.

Xu, X., Pommier, S., Arbov, T., Hutchings, B., Sootto, W., Foxcroft, G.R.: In vitro maturation and fertilization techniques for assessment of semen quality and boar fertility. *J. Anim. Sci.*, 1998, 76. 3079-3089.

Yanagimachi R.: Mammalian fertilization. In: Kobil A., Neill J.D. (eds.) *The Physiology of Reproduction.* Raven Press, New York, 1994, 189-317.

KÖSZÖNETNYÍLVÁNÍTÁS

Ezúton szeretnék köszönetet mondani konzulensemnek dr. habil Bali Papp Ágnesnek, Kovácsné dr. habil Gaál Katalinnak, Dr. Dr. h.c. Iváncsics János (†) professzor Úrnak, Pécsi Tamás úrnak a debreceni Mesterséges Termékenyítő Állomás vezetőjének, Détáriné Varga Klárinak és Tolnai Károlyné laboránsoknak munkám során nyújtott áldozatos segítségükért.