

DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

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

Programvezető:

Kovácsné dr. habil. Gaál Katalin
a mg-i tud. kandidátusa

Témavezető:

dr. habil. Bali Papp Ágnes
PhD

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

Készítette:

MAKKOSNÉ PETZ BRIGITTA

MOSONMAGYARÓVÁR

2007

A KUTATÁS ELŐZMÉNYEI, CÉLKITŰZÉS

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 jelenleg használatos fagyasztási eljárások nem tökéletesek. A túlélő mozgékony spermiumok mozgása más, kevésbé aktív, mint a friss ejakulátum spermiumaié (Verheyen és mtsai 1993). Fagyasztott sertés sperma 1975 óta szerezhető be mind pellet, mind szalmában tárolt formában (Johnson és mtsai 2000).

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 állattenyésztésben a hagyományos eljárások mellett jelentős szerep jut napjainkban az exponenciálisan fejlődő biotechnológiai módszereknek, így az in vitro fertilizációnak is. Az IVF rendszerekben alapvető fontosságú az alapanyagként szolgáló spermiumokból az élő és

motilis frakció szelektálása a további felhasználás 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 átmosják. Az egyik ilyen eljárás a Percoll-grádienseken történő centrifugálás vagy mosás (Devries és Colenbrander 1990, Mermillod és munkatársai (1992)). IVF rendszerekben a mosási eljárások mellett nagy szerepük van a különféle spermamigrációs eljárásoknak. A legismertebb ilyen migráltatási eljárás a swim-up (vagy felúsztatás) (Drevius 1972, Lopata és mtsai 1976). 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. Háziállatokon Parrish és munkatársai (1986) vezették először be a swim-up-ot.

Célkitűzések:

Az első kísérletsorozatunk 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 mozgásképeségében 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 vizsgálatsorozatban 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, membránintegritására és motilitására. 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.

ANYAG ÉS MÓDSZER

1. A VIZSGÁLATOK HELYSZÍNE

Kísérleteinket a Nyugat-Magyarországi Egyetem Mezőgazdaság- és Élelmiszertudományi Karának Állattudományi Intézetében, valamint a debreceni Mesterséges Termékenyítő Állomáson végeztük el.

2. SPERMAVIZSGÁLATI MÓDSZEREK

2.1. Motilitásvizsgálat

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

2.2. Festési eljárások

A Kovács Foote-féle festési eljárást (1992), és a Harrison Vickers fluoreszcens festési eljárást (1990) alkalmaztuk.

3. 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

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

Arra voltunk kíváncsiak, hogy rövid idejű tárolás során hogyan változik a sperma minősége, és hogy adódik-e különbség az eredményeket tekintve a kétféle festési módszert alkalmazva.

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 vizsgálatánál az derült ki, hogy 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				

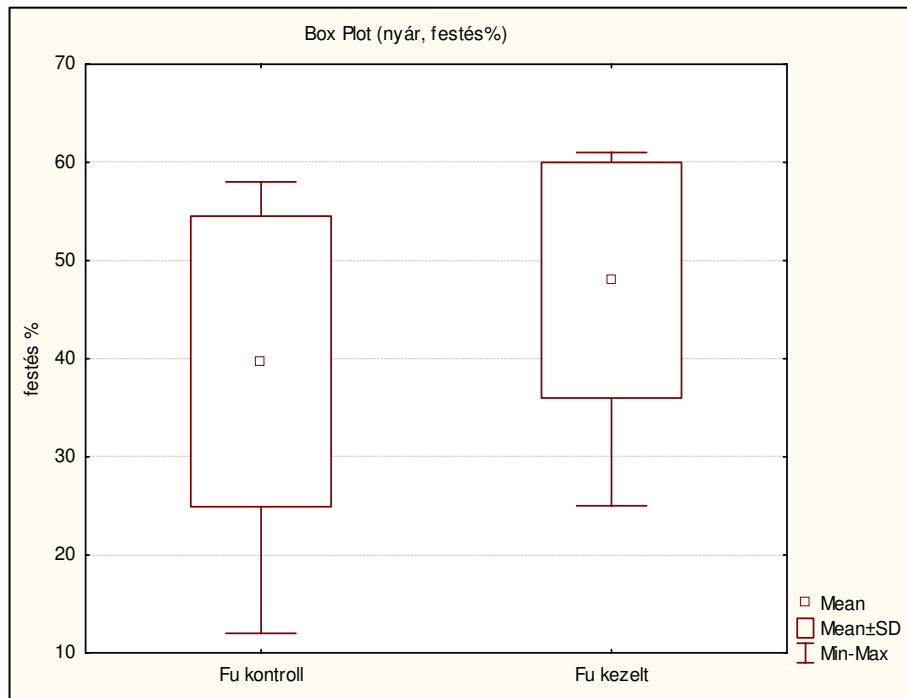
A fenti táblázatból látható, hogy az F értéke kisebb, mint a kritikus F érték, tehát, a két módszerrel is bemutatott minőségi változások tendenciasorainak szórásnégyzetei között nincs eltérés.

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. A fagyasztás előtti ekvilibrációs idő meghosszabbításának hatása a kanspermiumok membránintegritására

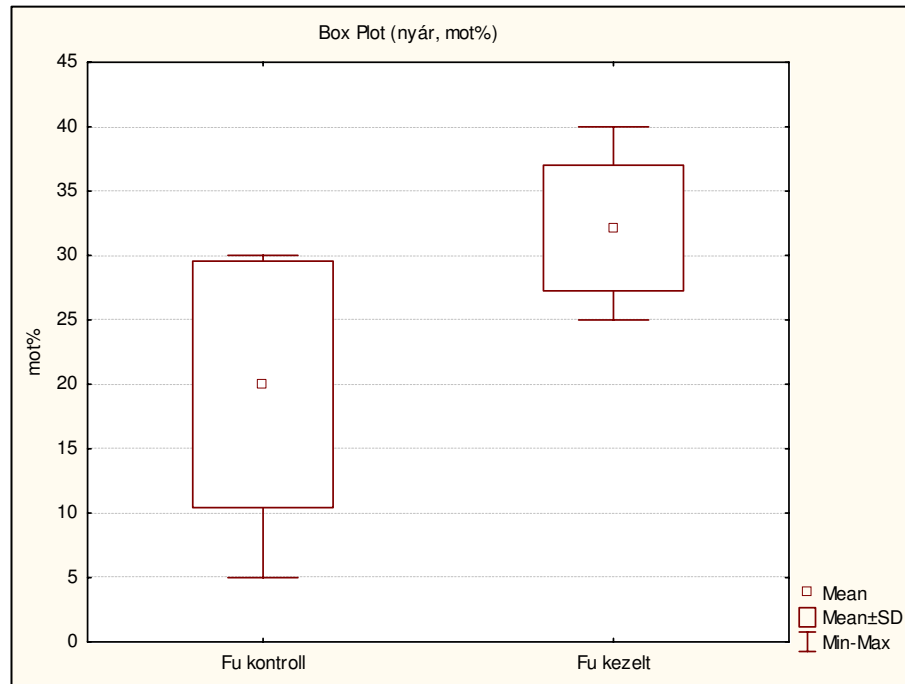
Ebben a kísérletsorozatban arra kerestük a választ, hogy a fagyasztást megelőző pihentetési időnek a meghosszabbítása milyen hatást gyakorol a termékenyítő anyag minőségére. Az esetleges szezonális különbségek feltárására az egész vizsgálatsorozatot kétszer hajtottuk végre, egyszer a nyár és egyszer az ősz folyamán.

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



1. 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)

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



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

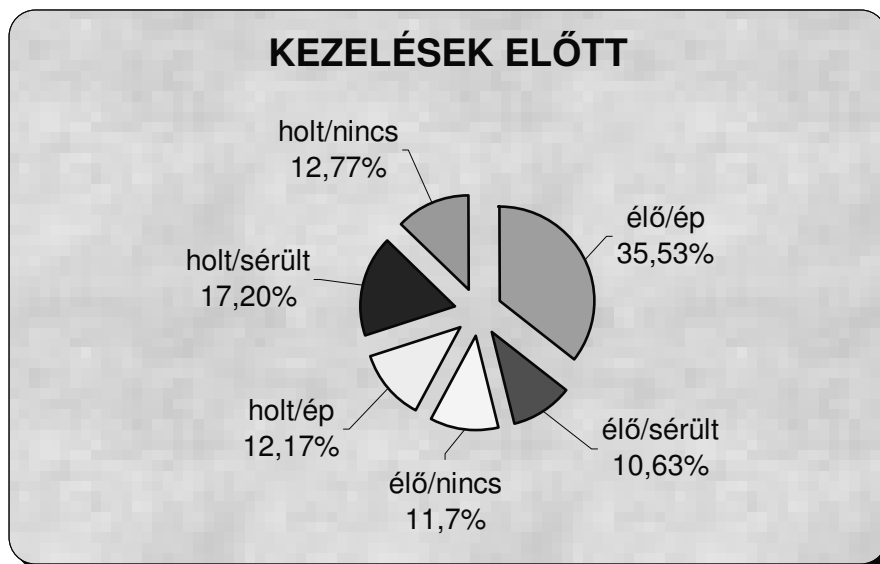
Mind a kezelt, mind a kontroll csoporton belüli vitalitást és motilitást együttesen feltáró festési eredményeket összehasonlítva a szabad szemmel végzett motilitási eredményekkel azt tapasztaltuk, hogy a közöttük adódó különbségek szignifikánsak.

A nyáron és ősszel elvégzett kísérletek eredményeit átlagoltuk és elvégeztük a t-próbát. Mind a festési eredmények, mind a szabad szemmel végzett motilitás vizsgálatok statisztikai értékelésekor szignifikáns eltérés volt kimutatható a kezelt csoport javára. Az egyes

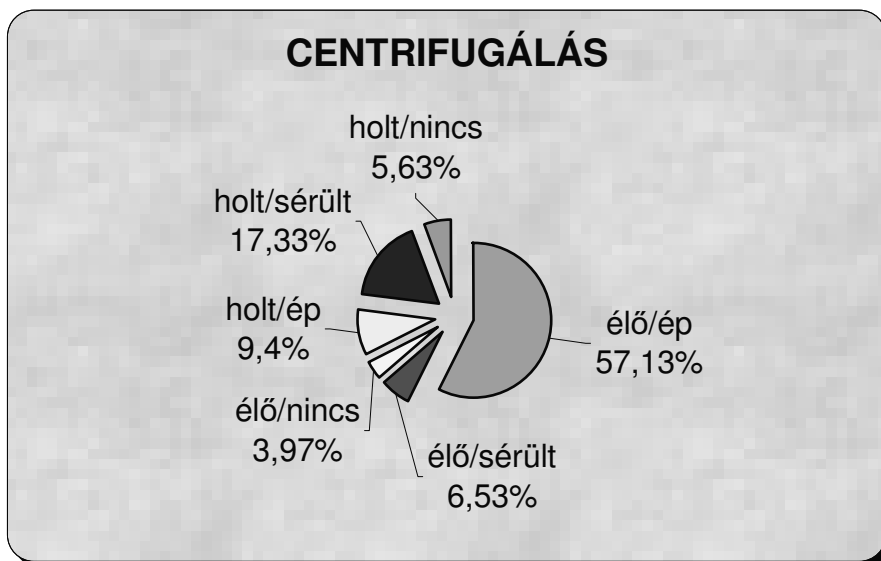
egyedek eredményeit is összehasonlítva azt tapasztaltuk, hogy közöttük nincs szignifikáns különbség. A nyáron és az ősszel elvégzett kísérlek eredményei között sem adódott szignifikáns eltérés.

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

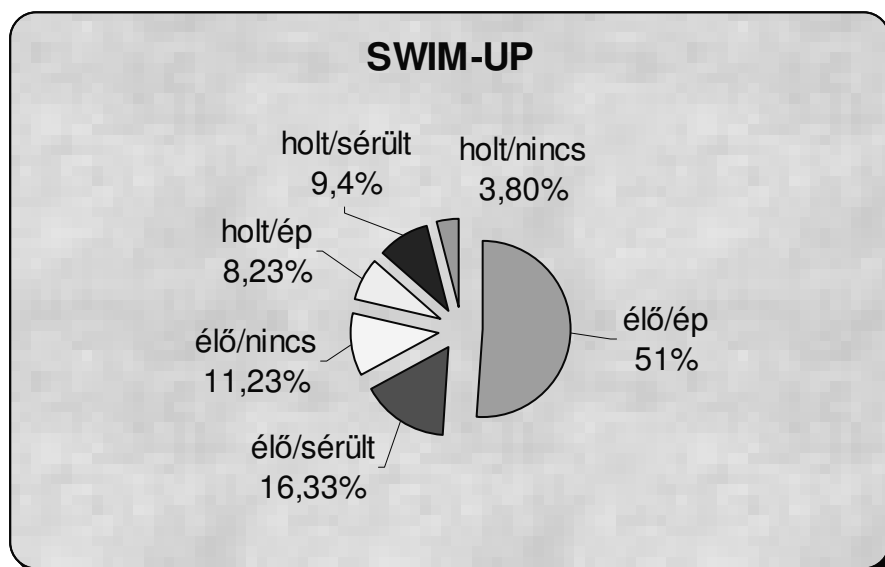
Ezúttal a fagyasztás és felolvasztás utáni számos spermakezelési eljárás közül a rövid idejű centrifugálás (10 perc 200g-n), a swim-up (Sperm TALP médiumon keresztül) és a Percoll grádiens kezelések kanspermára gyakorolt hatásait vizsgáltuk. A kísérletekből a három kezelés hatékonysága közötti különbségekre is fény derült.



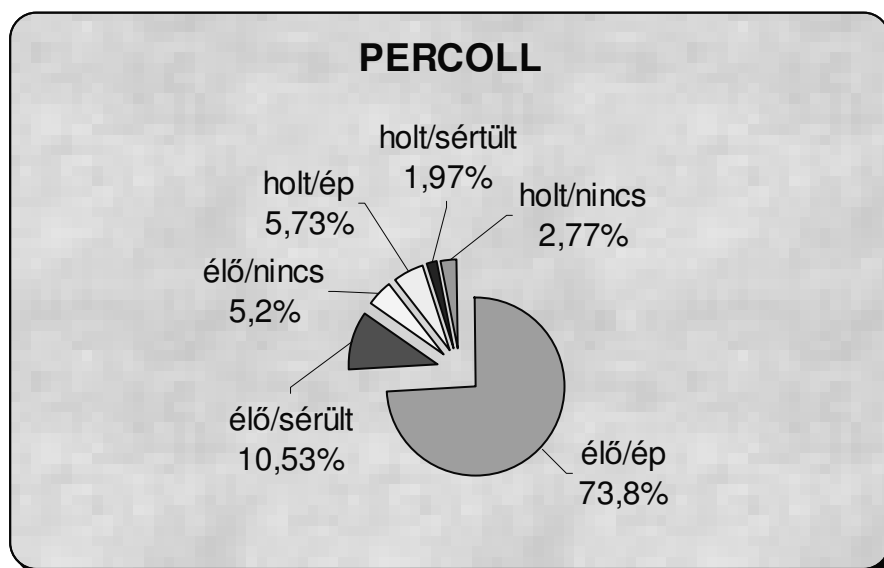
3. ábra. A különböző spermiumkategóriák alakulása a kezelés előtt



4. ábra. A különböző spermiumkategoróriák alakulása a centrifugálás után



5. ábra. A különböző spermiumkategoróriák alakulása a felúsztatás után



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

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. 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.

ÚJ KUTATÁSI 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 pihentetés 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.

JAVASLATOK

A kansperma rövid idejű tárolása alatti minőségi változásának nyomon követésére kétféle in vitro festési módszert használtunk. Vizsgálataink során a Kovács-Foote-féle (1992) festést, és a módosított Harrison és Vickers fluoreszcens festést (1990) is 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 következtettünk. 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 javaslom, mert kivitelezése egyszerű, nem igényel speciális laboratóriumi körülményeket, és a sejtek vitalitásán kívül az akroszóma és a farokmembrán integritásáról is árnyalt képet kapunk.

Kísérleteinkben az ekvibrációs idő meghosszabbítása kedvező hatással volt a spermiumok életképességére, az élő, ép akroszómájú és motilis spermiumok aránya szignifikánsan magasabb volt a hosszabb pihentetés követően, mint a kontroll esetében. Kísérleteinkben a hosszabb pihentetés a spermiumok mozgási képességében is szignifikáns változást okozott.

A fagyasztott visszaolvasztott termékenyítő anyagon számos kutató végzett el centrifugálásos, Percoll-os és swim up-os kezelést. 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. A különböző kezelések közül a Percoll grádiens kezelés bizonyult a leghatékonyabbnak. A nagyüzemi sertéstermelésben az egyszerűen kivitelezhető Percollos előkezelést feltétlen javasoljuk, hogy a mesterséges termékenyítés tökéletesebbé váljon, és szélesebb körben elterjedhessen.

References:

- Almid T., Hofmo P.O.: *Reprod. Dom. Anim*, 1996, 5, 117-125.
- Devries A.C., Colenbrander B.: *Int. J. Biochem.* 1990, 22, 519-524.
- Drevius L.O.: *J. Reprod. Fertil.* 1972, 24, 427-432.
- Harrison R.A.P, Vickers S.E: *J. Reprod. Fert.* 1990, 88, 343-352.
- Johnson L.A.: *Proc. 15th Int. Pig Vet. Soc. Congress Vol 1*, 1998, 225-229.
- Johnson L.A., Weitze K.F., Fiser P., Maxwell W.M.C.: *Anim. Reprod. Sci.*, 2000, 62, 143-172.
- Kovács A., Foote R.H.: *Biot. Histoc.* 1992, 67, 119-124.
- Lopata A., Patullo M.J., Chang A., James B.: *Fertil. Steril.* 1976, 27, 677-684.
- Mermillod P., Massip A., Dessy F.: *Int. J. Dev. Biol.* 1992, 36, 185-195.
- Parrish J.J., Susco-Parrish J.L., Leibfried-Rutledge M.L., Critser E.S., Eyestone W.H., First N.L.: *Therio.* 1986, 25, 591-600.
- Polge C.: *Vet. Rec.* 1956, 68, 62-76.
- Pursel V.G., Johnson L.A., Schulman L.L.: *J. Anim. Sci.* 1972, 35, 580-584.
- Tuli R.K., Schmidt-Baulain R., Holtz W.: *Therio.* 1992, 38, 487-490.
- Verheyen G., Pletincx I., VanSteirteghem A.: *Hum. Reprod.* 1993, 8, 1678-1684.

AZ ÉRTEKEZÉS TÉMAKÖRÉBŐL ÍRT TUDOMÁNYOS KÖZLEMÉNYEK

Lektorált lapokban megjelent tudományos közlemények:

1. **B. Petz Makkosné – E. Deak – Á. Bali Papp - J. Iváncsics (2003):** Examination of different boar' semen during short storage. Állattenyésztés és Takarmányozás 51 131-136
2. **E. Varga – B. Petz Makkosné – E. Gajdócsi – I. Salamon – Á. Bali Papp (2007):** Vitrification of in vitro matured oocytes of Mangalica (Hungarian native breed pig) and Large White pig. Acta Veterinaria Hungarica (accepted) (IF: 0535)
3. **Makkosné Petz B. – Salamon I. – Koltai J. – Pécsi T. – Bali Papp Á. (2007):** A fagyasztás előtti ekvibrációs idő meghosszabbításának hatása a kanspermiumok membránintegritására. Acta Agraria Kaposvariensis (megjelenés alatt)
4. **Makkosné Petz B. – Kiss R. – Bali Papp Á (2007):** A sertés termékenyítő anyag tárolásának történeti áttekintése. Acta Agraria Kaposvariensis (megjelenés alatt)

Lektorált lapokban megjelent abstractok:

1. **B. Petz – Á. Bali Papp – T. Somfai – L. Nánássy – T. Pécsi – J. Iváncsics (2002):** Effect of percoll or short time centrifugation treatment on viability and acrosome integrity of frozen/thawed boar spermatozoa. Theriogenology (Abst.) 57 681. (IF: 2,387)

Konferencia kiadványokban megjelent közlemények

1. **Makkosné Petz B. - Bali Papp Á. – Kovácsné Gaál K. (2003):** A spermamélyhűtés, mint a biológiai diverzitás megőrzésének egyik lehetséges módszere V. Magyar Genetikai Kongresszus Siófok, április 13-15. 53-54. (előadás)

2. **Bali Papp Á. - Makkosné Petz B. —Nánássy L. –Pécsi T. – Dohy J. - Iváncsics J. (2002):** Különböző kezelések hatása mélyhűtött/visszaolvasztott sertés spermiumokra. XXIX. Óvári Tudományos Napok: Agrártermelés- Életminőség. Mosonmagyaróvár, október 3-4. Előadások és poszter összefoglaló anyaga 29.(poszter)
3. **Makkosné Petz B. - Bali Papp Á. - —Nánássy L. –Pécsi T. -- Iváncsics J. (2002):** Sertéskanok termékenyítő anyagának mélyhűthetősége a szezon függvényében. XXIX. Óvári Tudományos Napok: Agrártermelés- Életminőség. Mosonmagyaróvár, október 3-4. Előadások és poszter összefoglaló anyaga 60.(poszter)
4. **A. Bali Papp - T. Somfai - B. Petz - L. Nánássy T. Pécsi– J. Iváncsics (2001):** How can influence the different treatment of frozen/thawed boar spermatozoa viability. BOKU International Congress, 18-21. November, Wien, Austria 181. (poster)
5. **Á Bali Papp - T. Somfai – Zs. Angyal – B. Petz – T. Pécsi – Sz. Bodó – J. Iváncsics (2001):** Effect of percoll and swim up treatment on viability and acrosome integrity of frozen/thawed boar spermatozoa Second International Workshop on Mammary Gland Biotechnology 30-31 August, Budapest, Hungary 34. (poster)
6. **Makkosné Petz B. – Baráth Zs. – Nagy Sz. – Bali Papp Á. – Iváncsics J. (2000):** Különböző kanok termékenyítő anyagának vizsgálata rövid idejű tárolás során. XXVIII. Óvári Tudományos Napok: Az élelmiszergazdaság fejlesztésének lehetőségei. Mosonmagyaróvár, Állattenyésztési Szekció I. köt. 239-243. (poszter)