

**Kossperma mélyhűtés továbbfejlesztése  
fázisvizsgálatok eredményei alapján**

**doktori értekezés**

**Csiba Anita**

**doktorjelölt**

**2015**

**DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS**

**NYUGAT-MAGYARORSZAGI EGYETEM  
MEZŐGAZDASÁG- ÉS ÉLELMISZERTUDOMÁNYI KAR  
MOSONMAGYARÓVÁR  
ÁLLATÉLETTANI ÉS BIOTECHNOLÓGIAI TANSZÉK**

*Wittmann Antal Növény-, Állat- és Élelmiszer-tudományi Multidiszciplináris Doktori Iskola*

Doktori Iskola vezető:

**Prof. Dr. Neményi Miklós**

egyetemi tanár

az MTA levelező tagja

*Ujhelyi Imre Állattudományi Doktori Program*

Programvezető:

**Prof. Dr. Szabó Ferenc DSc**

egyetemi tanár

Témavezető:

**Dr. Gergátz Elemér CSc**

egyetemi docens

**KOSSPERMA MÉLYHŰTÉS TOVÁBBFEJLESZTÉSE FÁZISVIZSGÁLATOK  
EREDMÉNYEI ALAPJÁN**

Készítette:

**Csiba Anita**

**MOSONMAGYARÓVÁR**

**2015**

KOSSPERMA MÉLYHŰTÉS TOVÁBBFEJLESZTÉSE FÁZISVIZSGÁLATOK  
EREDMÉNYEI ALAPJÁN

Értekezés doktori (PhD) fokozat elnyerése érdekében  
a Nyugat-magyarországi Egyetem Wittmann Antal Növény-, Állat- és Élelmiszer-tudományi  
Multidiszciplináris Doktori Iskolája  
Ujhelyi Imre Állattudományi Doktori Programja

Írta:  
**Csiba Anita**

Témavezető: **Dr. Gergátz Elemér DVM, PhD**

Elfogadásra javaslom (igen / nem) .....

(aláírás)

A jelölt a doktori szigorlaton 100 %-ot ért el.

Mosonmagyaróvár, .....

.....  
a Szigorlati Bizottság elnöke

Az értekezést bírálóként elfogadásra javaslom (igen /nem)

Első bíráló (Dr. ....) igen /nem

(aláírás)

Második bíráló (Dr. ....) igen /nem

(aláírás)

(Esetleg harmadik bíráló (Dr. ....) igen /nem

(aláírás)

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

Mosonmagyaróvár,

.....  
a Bírálóbizottság elnöke

A doktori (PhD) oklevél minősítése.....

.....  
Az EDT elnöke

## Tartalom

<b>1. BEVEZETÉS .....</b>	<b>14</b>
<b>2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS .....</b>	<b>17</b>
<b>2.1 A KOSOK SZAPORÍTÓANYAG TERMELESÉNEK SZABÁLYOZÁSA.....</b>	<b>17</b>
<b>2.1.1 A HÍM NEMI MŰKÖDÉS HORMONÁLIS SZABÁLYOZÁSA .....</b>	<b>17</b>
<b>2.1.2. ÉVSZAKAHATÁS.....</b>	<b>18</b>
<b>2.2. SPERMIMUMOK FELÉPÍTÉSE ÉS ÉLETJELENSÉGEI .....</b>	<b>24</b>
<b>2.2.1. EJAKULÁTUM .....</b>	<b>24</b>
<b>2.2.2. A SPERMIMUMSEJT .....</b>	<b>26</b>
<b>2.2.3.SPERMIMUM MORFOLÓGIÁJA ÉS ÉLETJELENSÉGEI.....</b>	<b>28</b>
<b>2.2.4. A SPERMIMUMOK UTÓÉRÉSE .....</b>	<b>29</b>
<b>2.2.5. SPERMIMUMTRANSPORT .....</b>	<b>31</b>
<b>2.2.6. A SPERMIMUMOK ÉRÉSI ÁTALAKULÁSA A NŐI NEMI UTAKBAN.....</b>	<b>31</b>
<b>2.2.7. A TERMÉKENYÜLÉS.....</b>	<b>32</b>
<b>2.3.MESTERSÉGES TERMÉKENYÍTÉSRE ALKALMAS KOSSPERMA MINŐSÉGI PARAMÉTEREI.....</b>	<b>35</b>
<b>2.4. KOSSPERMA MINŐSÉGÉNEK ELLENŐRZÉSE .....</b>	<b>40</b>
<b>2.4.1. SPERMAMINŐSÉG ÉS FERTILITÁS .....</b>	<b>40</b>
<b>2.4.2. SPERMAMINŐSÉG VIZSGÁLATÁNAK MÓDSZEREI .....</b>	<b>40</b>
<b>2.5. SPERIUMSEJTEK MÉLYHÚTÉSE .....</b>	<b>43</b>
<b>2.5.1. A MODERN KORI KRIOBOLÓGIA KEZDETE/ELSŐ EREDMÉNYEI.....</b>	<b>43</b>
<b>2.5.2. AZ IVARSEJTEK/EMBRIÓK MÉLYHÚTÉSÉNEK ELMÉLETI ALAPJAI .....</b>	<b>43</b>



<b>2.5.2.1. A SEJTEK TÚLÉLÉSÉT MEGHATÁROZÓ TÉNYEZŐK .....</b>	<b>44</b>
<b>2.5.2.2. AZ IVARSEJTEK/EMBRIÓK MÉLYHŰTÉSI TECHNOLÓGIÁJÁNAK LÉPÉSEI.....</b>	<b>44</b>
<b>2.5.2.2.1. MÉLYHŰTÉS TÍPUSAI .....</b>	<b>45</b>
<b>2.5.3. KOSSPERMA MÉLYHŰTÉS SZAKIRODALOMBAN PUBLIKÁLT MÓDSZEREI.....</b>	<b>45</b>
<b>2.5.3.1. MÉLYHŰTÉS MÓDSZERE (HÍGÍTÁS, ELŐHŰTÉS, KISZERELÉS).....</b>	<b>45</b>
<b>2.5.3.2. A SPERMAPLAZMÁBAN TALÁLHATÓ FEHÉRJÉK MEGAKADÁLYOZZÁK A KOSSPERMA HIDEGSOKK HATÁSÁRA BEKÖVETKEZŐ MEMBRÁNKÁROSODÁSÁT .....</b>	<b>48</b>
<b>2.5.3.3 MOTILITÁS JAVÍTÁSA ÉS DEKAPACITÁCIÓ A MÉLYHŰTÖTT KOSSPERMA VISSZAMELEGÍTÉSÉT KÖVETŐEN .....</b>	<b>50</b>
<b>2.5.3.4. A SPERMAPLAZMA ÖSSZETÉTELÉNEK SZEZONÁLIS VÁLTOZÁSAI ÉS ANNAK HATÁSA A MÉLYHŰTÉS UTÁN FELOLVASZTOTT KOSSPERMÁRA.....</b>	<b>54</b>
<b>2.5.3.5. SZEZONÁLIS VÁLTOZÁS A SPERMAPLAZMA VISSZAOLVASZTOTT KOSSPERMA MEMBRÁNJÁRA GYAKOROLT VÉDŐ HATÁSÁBAN.....</b>	<b>55</b>
<b>2.5.3.6. A HIDEGSOKK ÉS A HŰTÉSI SEBESSÉG MÉRTÉKÉNEK HATÁSA A KOSSPERMIUMOK KALCIUM FELVÉTELÉRE.....</b>	<b>57</b>
<b>2.6. KOSSPERMA TÁROLÁSA .....</b>	<b>60</b>
<b>2.6.1. A MESTERSÉGES TERMÉKENYÍTÉS ÉS SPERMA TARTÓSÍTÁS TÖRTÉNETI ÁTTEKINTÉSE.....</b>	<b>60</b>
<b>2.6.2. HÍGÍTÁS.....</b>	<b>62</b>
<b>2.6.2.1. LAKTÓZ ALAPÚ HÍGÍTÓK.....</b>	<b>62</b>
<b>2.6.2.2. GLICERIN, MINT KRIOPROTEKTÍV ANYAG .....</b>	<b>64</b>
<b>2.6.2.3. TOJÁSSÁRGÁJA, MINT ÖSSZETEVŐ .....</b>	<b>67</b>
<b>2.6.3. A MÉLYHŰTÉS ÉS FELOLVASZTÁS.....</b>	<b>67</b>
<b>2.6.3.1. A MÉLYHŰTÖTT SPERMA FELOLVASZTÁSA .....</b>	<b>69</b>

<b>2.6.3.2. SPERMIUMSEJTEK KÁROSODÁSA A MÉLYHŰTÉS UTÁNI FELOLVASZTÁST KÖVETŐEN .....</b>	<b>71</b>
<b>2.6.3.3. MÉLYHŰTÉS ÉS VISSZAOLVASZTÁS KÖVETKEZTÉBEN BEKÖVETKEZŐ MOTILITÁS CSÖKKENÉS.....</b>	<b>73</b>
<b>2.7. MESTERSÉGES TERMÉKENYÍTÉS .....</b>	<b>74</b>
<b>2.8. KOSSPERMA MINŐSÉG VIZSGÁLATÁNAK EREDMÉNYEI A NEMZETKÖZI SZAKIRODALOMBAN .....</b>	<b>75</b>
<b>2.8.1. FRISSEN VETT ÉS INKUBÁLT TERMÉKENYÍTŐ ANYAGGAL VÉGZETT TERMÉKENYÍTÉSEK EREDMÉNYEI .....</b>	<b>75</b>
<b>2.8.2. KAPACITÁCIÓSZERŰ ELVÁLTOZÁSON-, AKROSZÓMA REAKCIÓN ÁTESETT SEJTEK ARÁNYÁNAK MEGHATÁROZÁSA INKUBÁCIÓ ÉS MÉLYHŰTÉS UTÁN.....</b>	<b>76</b>
<b>2.8.3. MÉLYHŰTÖTT SZAPORÍTÓANYAG ELŐÁLLÍTÁSÁNAK MÓDSZEREI ÉS CERVIKOUTERINÁLIS TERMÉKENYÍTÉSSEL TÖRTÉNŐ FELHASZNÁLÁS EREDMÉNYEI .....</b>	<b>78</b>
<b>2.8.4. MÉLYHŰTÖTT SZAPORÍTÓANYAG ELŐÁLLÍTÁSÁNAK MÓDSZEREI ÉS MÉHSZARVAKBA TÖRTÉNŐ MESTERSÉGES TERMÉKENYÍTÉSHEZ TÖRTÉNŐ FELHASZNÁLÁS SORÁN KAPOTT TERMÉKENYÍTÉS EREDMÉNYEI .....</b>	<b>83</b>
<b>3. ANYAG ÉS MÓDSZER .....</b>	<b>86</b>
<b>3.1. VIZSGÁLATBA BEVONT ÁLLATOK.....</b>	<b>87</b>
<b>3.1.1. KOSOK .....</b>	<b>87</b>
<b>3.1.2. BAKKECSKE .....</b>	<b>87</b>
<b>3.2.VIZSGÁLATOK.....</b>	<b>87</b>
<b>3.3.VIZSGÁLATOK MÓDSZERE .....</b>	<b>88</b>
<b>3.3.1. FÉNYMIKROSKÓPOS VIZSGÁLAT .....</b>	<b>88</b>
<b>3.3.2. MÉLYHŰTÉSRE VALÓ ELŐKÉSZÍTÉS MENETE.....</b>	<b>89</b>
<b>3.3.2.1. KÉT LÉPÉSES HÍGÍTÁS.....</b>	<b>89</b>
<b>3.3.2.2.HŰTÉS, ELŐKÉSZÍTÉS FÁZISAI.....</b>	<b>90</b>
<b>3.3.2.3. HŰTÉSI SEBESSÉG.....</b>	<b>91</b>

<b>3.3.2.4. MÉLYHŰTÉS UTÁNI VISSZAMELEGÍTÉS</b>	<b>92</b>
<b>3.3.3. KAPACITÁCIÓSZERŰ ELVÁLTOZÁSON ÉS AKROSZÓMA-REAKCIÓN ÁTESETT SEJTEK ARÁNYÁNAK MEGHATÁROZÁSA CTC FLUORESCENS FESTÉSI ELJÁRÁSSAL</b>	<b>93</b>
<b>3.3.3.1. MÉLYHŰTÉS SORÁN-, VALAMINT A NŐI NEMI UTAKBAN BEKÖVETKEZŐ VÁLTOZÁSOK</b>	<b>96</b>
<b>3.3.3.1.1. KAPACITÁCIÓ</b>	<b>96</b>
<b>3.3.3.1.2. AKROSZÓMA-REAKCIÓ</b>	<b>97</b>
<b>3.3.3.1.3. A KAPACITÁCIÓ ÉS AZ AKROSZÓMA-REAKCIÓ SZEREPE A MEGTERMÉKENYÍTÉS FOLYAMATÁBAN DOBOZY, 2007 SZERINT ...</b>	<b>98</b>
<b>3.3.3.1.4. A MÉLYHŰTÉS HATÁSÁRA KÜLÖNBÖZŐ ELVÁLTOZÁSON ÁTESETT SEJTEK ARÁNYÁNAK MEGHATÁROZÁSA HAMUPIPŐKE SZÁMLÁLÓ PROGRAM SEGÍTSÉGÉVEL</b>	<b>99</b>
<b>3.3.4. ÉVSZAKHATÁS VIZSGÁLATA</b>	<b>100</b>
<b>3.3.5. DEKAPACITÁCIÓ VIZSGÁLATA</b>	<b>101</b>
<b>3.3.5.1. DEKAPACITÁCIÓ MÉRTÉKÉNEK MEGHATÁROZÁSA</b>	<b>101</b>
<b>3.3.6. INKUBÁCIÓS KÍSÉRLETEK</b>	<b>103</b>
<b>3.3.7. TERMÉKENYÍTÉS</b>	<b>104</b>
<b>4. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK</b>	<b>105</b>
<b>4.1. 2007-ES EREDMÉNYEK</b>	<b>105</b>
<b>4.1.1. HÍGÍTOTT 2-4°C-ON HŰTÖTT SZAPORÍTÓANYAG ÉLŐSEJTSZÁM % EREDMÉNYEI 2007.</b>	<b>105</b>
<b>4.1.2. HÍGÍTOTT 2-4°C-ON HŰTÖTT SZAPORÍTÓANYAG EREDMÉNYEI SEJTMEMBRÁN ÉS AKROSZÓMA ÁLLAPOTÁNAK 2007. ÉVI VIZSGÁLATI EREDMÉNYEI</b>	<b>107</b>
<b>4.1.3. HÍGÍTOTT 2-4°C-ON HŰTÖTT SZAPORÍTÓANYAGGAL TÖRTÉNŐ SIKERES TERMÉKENYÍTÉSEK SZÁZALÉKOS ARÁNYÁNAK 2007. ÉVI EREDMÉNYEI</b>	<b>115</b>
<b>4.2.FÁZISVIZSGÁLATOK EREDMÉNYEI A MÉLYHŰTÉS SORÁN (2008)</b>	<b>118</b>

<b>4.2.1. AZ EGYES KOSOK SZAPORÍTÓANYAGÁNAK MÉLYHŰTÉSRE VALÓ ALKALMASSÁGÁNAK VIZSGÁLATA.....</b>	<b>118</b>
4.2.1.1. KOS- ÉS BAKSPERMA KAPACITÁCIÓSZERŰ MEMBRÁNVÁLTOZÁSAINAK ÉS AKROSZÓMA-REAKCIÓJÁNAK VIZSGÁLATA FLUORESZCENS FESTÉSI ELJÁRÁSSAL .....	118
4.2.1.2. FÉNYMIKROSKÓPOS VIZSGÁLATOK .....	135
<b>4.3. ÉVSAKHATÁS VIZSGÁLAT .....</b>	<b>137</b>
4.3.1. EJAKULÁTUMOK MENNYISÉGÉNEK VÁLTOZÁSA AZ ÉVSAKTÓL FÜGGŐEN.....	138
4.3.2. ÉVSAKONKÉNT VÁLTOZÓ ÉLŐSEJTSZÁM % A KÜLÖNBÖZŐ DEKAPACITÁLÓ FAKTOROKAT TARTALMAZÓ OLDATOKBAN A MÉLYHŰTÉST KÖVETŐ VISSZAMELEGÍTÉS UTÁN .....	139
4.3.3. CTC FLUORESZCENS FESTÉSI ELJÁRÁSSAL VÉGZETT ÉVSAKHATÁS VIZSGÁLATOK EREDMÉNYEI.....	142
4.3.3.1. ÉP MEMBRÁNNAL RENDELKEZŐK ARÁNYA .....	142
4.3.3.2. KAPACITÁCIÓSZERŰ VÁLTOZÁSON ÁTESETT SPERMIMUMOK ARÁNYA .....	143
4.3.3.3. AKROSZÓMA-REAKCIÓN ÁTESETT SPERMIMUMSEJTEK ARÁNYA .....	145
<b>4.4. 2009-ES EREDMÉNYEK.....</b>	<b>146</b>
4.4.1. KOSSPERMA MENNYISÉGE .....	146
4.4.2. DEKAPACITÁLÓ FAKTOROK HASZNÁLATÁNAK ÉLŐSEJTSZÁMRA GYAKOROLT HATÁSA.....	147
4.4.3. DEKAPACITÁLÓ FAKTOROKAT TARTALMAZÓ OLDATOK HATÁSA A DEKAPACITÁCIÓS FOLYAMATOKRA A VISSZAMELEGÍTÉST KÖVETŐEN.....	149
4.4.4. INKUBÁCIÓS KÍSÉRLETEK EREDMÉNYE .....	150
<b>5. KÖVETKEZTETÉSEK.....</b>	<b>152</b>
5.1. A 2007-BEN HÍGÍTOTT 2-4°C-ON HŰTÖTT SZAPORÍTÓANYAG ÉLŐSEJTSZÁM % EREDMÉNYEIBŐL LEVONHATÓ KÖVETKEZTETÉSEK .....	152

<b>5.2. HÍGÍTOTT 2-4°C-ON HÚTOTT SZAPORÍTÓANYAG EREDMÉNYEI SEJTMEMBRÁN ÉS AKROSZÓMA ÁLLAPOTÁNAK 2007. ÉVI VIZSGÁLATI EREDMÉNYEIBŐL LEVONHATÓ KÖVETKEZTETÉSEK .....</b>	<b>152</b>
<b>5.3. HÍGÍTOTT 2-4°C-ON HÚTOTT SZAPORÍTÓANYAGGAL TÖRTÉNŐ SIKERES TERMÉKENYÍTÉSEK SZÁZALÉKOS ARÁNYÁNAK 2007. ÉVI EREDMÉNYEIBŐL LEVONHATÓ KÖVETKEZTETÉSEK.....</b>	<b>153</b>
<b>5.4. MÉLYHÚTÉSRE VALÓ ALKALMASSÁG MEGHATÁROZÁSA CTC FLUORESZCENS FESTÉSI ELJÁRÁSSAL VÉGZETT FÁZISVIZSGÁLATOK EREDMÉNYEI ALAPJÁN.....</b>	<b>154</b>
<b>5.5. MÉLYHÚTÉSRE VALÓ ALKALMASSÁG MEGHATÁROZÁSA FÉNYMIKROSKÓPPAL VÉGZETT VIZSGÁLATOK EREDMÉNYEI ALAPJÁN.....</b>	<b>156</b>
<b>5.6. KÖVETKEZTETÉSEK, JAVASLATOK A 2008-BAN VÉGZETT ÉVSZAKHATÁS VIZSGÁLATTAL KAPCSOLATBAN.....</b>	<b>157</b>
<b>5.7. A 2009-BEN VÉGZETT VIZSGÁLATOKRA VONATKOZÓ KÖVETKEZTETÉSEK, JAVASLATOK.....</b>	<b>159</b>
<b>6. ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK.....</b>	<b>161</b>
<b>7. ÖSSZEFOGLALÁS.....</b>	<b>164</b>
<b>KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS.....</b>	<b>172</b>
<b>8. IRODALOMJEGYZÉK.....</b>	<b>173</b>

## KOSSPERMA MÉLYHŰTÉS TOVÁBBFEJLESZTÉSE FÁZISVIZSGÁLATOK EREDMÉNYEI ALAPJÁN

### **Kivonat**

A mesterséges termékenyítéshez szükséges termékenyítőanyag előállítása a juhtenyésztésben nagyon fontos feladat. Hazánkban az inszeminált anyajuhok aránya az országos anyajuhlétszámhoz viszonyítva meglehetősen alacsony. A mesterséges termékenyítést alkalmazó gazdaságok aránya Magyarországon 20-25% körüli. Az inszeminált anyajuhok aránya pedig még ennél is kevesebb kb. 2%. Ezen az arányon érdemes lenne javítani, hiszen a mesterséges termékenyítés napjainkban egyre fontosabb szerepet tölt be az állattenyésztésben. Az állományok genetikai anyagának gyors javítása érdekében alkalmazzák, mivel általa egy értékes tenyészállat termékenyítő anyaga széles körben felhasználhatóvá válik. Sajnos napjainkban a mesterséges termékenyítés a magyarországi juhtenyésztés gyakorlatában még korántsem mondható elterjedtnek. A termékenyítés széles körben való elterjesztéséhez megfelelő mennyiségű és minőségű termékenyítő anyagra van szükség. A megfelelő mennyiségű és minőségű termékenyítő anyag előállításához és tárolásához pedig a 2-4°C-on történő hűtve tárolás mellett elengedhetetlen a mélyhűtött termékenyítőanyag előállítása és tárolása is, amely a juh esetében még nem teljesen megoldott. A kossperma ugyanis sokkal érzékenyebb a mélyhűtésre való előkészítés és a mélyhűtés hatására bekövetkező károsodás szempontjából, ezért a

széles körű alkalmazhatóság érdekében nagyon fontos a mélyhűtési technológia továbbfejlesztése.

A kos szaporító anyagának tartósítása során a különböző egyedektől különböző időszakokban (őszi fő- és tavaszi pótszezonban) vett minták ellenőrző vizsgálata alapján megállapítható volt, hogy a különböző egyedek őszi fő- és tavaszi pótszezonban vett mintái közül melyek a mélyhűtésre alkalmasak. Jelentős különbségek mutatkoznak továbbá az egyes kosoktól, illetve anyajuhoktól vett vérsavók dekapacitáló hatásában azon tulajdonságát tekintve, hogy alkalmas e a spermaplazma a kosok szaporító anyagának dekapacitációjára a mélyhűtés utáni visszamelegítést követően. A dekapacitációs vizsgálatok mellett a dekapacitáló faktorokat tartalmazó oldatok élősejtszámra gyakorolt hatásának vizsgálata is elvégzésre került. Legvégül pedig az inkubációs vizsgálatokkal a mélyhűtés utáni visszamelegítést követően a különböző szaporítóanyag minták életképessége került ellenőrzésre.

Az eredmények értékelésekor fény derül az egyes tenyészállatoktól származó szaporító anyag mélyhűtésre való alkalmassága közötti különbségekre, illetve a különböző összetételű dekapacitáló faktorokat tartalmazó visszamelegítő oldatok hatásának különbségeire.

A vizsgálatok során a mélyhűtés módszertanával kapcsolatos számos tapasztalat is összegyűlt, amely megfigyeléseken alapul, mint például az egyensúlyozási idő optimalizálása, analitikai tisztaságú glicerin hatékonyabb alkalmazása a visszamelegítő oldatban. A szakirodalmak

tanulmányozása során szerzett további ismeretek segítségével a mélyhűtési technológia továbbfejleszthető. Ilyen például a mélyhűtésre való előkészítés során a közvetlen spermavételt követően a termékenyítőanyaghoz 20 V%-ban hozzáadott spermaplazma javító hatása, amelynek a kapacitációszerű elváltozások megakadályozásában van fontos szerepe. Hasonló szakirodalomból összegyűjtött módszertani tapasztalat még a mélyhűtéshez használt hígító szénhidráttartalmának növelése és optimális szénhidrátösszetételének javítása érdekében hozzáadott gumiarábikum, illetve a mélyhűtés előtt krioprotektív anyagként a 2-4°C-on a termékenyítő anyaghoz adott 2-es számú hígítóhoz hozzáadott analitikai tisztaságú glicerin. Ez utóbbi a gyakorlatban is alkalmazásra került és messzemenőig beváltotta a hozzá fűzött reményeket.



## **THE DEVELOPMENT OF RAM SEMEN DEEP-FREEZING METHODS BASED ON THE RESULTS OF PHASE EXPERIMENTS**

### **Abstract**

The quality control with various methods of frozen ram semen and optimize the cryopreservation technology are a very important tasks. Results of ram semen cooling at 2-4°C and cryopreservation experiments are presented in this study. The experiments were occurred with light microscopy and CTC fluorescent staining in the various stages of ram semen samples preparing for cryopreservation procedure and thawing in the various composition solution with decapitation factors. Overall, these two types of tests gives the results, which determine the suitability of the semen for insemination. Experience has shown, that variety rams for use propagating deep-freezing semen samples are very different, and the autumn and spring samples showed differences too. The results demonstrated the necessity of using decapitation factors. In my study the results of controlling at different stages of freezing and thawing -, decapitation - and incubation experiments were analysed, and compared with the results, that already published in similar topic.

## 1. BEVEZETÉS

A kossperma mélyhűtés kérdése napjainkban még nem egyértelműen megoldott. Az eredményes termékenyítés különböző mélyhűtési eljárásokkal műszalmában és pelletben mélyhűtött termékenyítőanyaggal sok esetben kizárólag sebészeti úton, vagy félsebészeti úton laparoszkópos eljárással a méhszarvakba juttatott termékenyítő anyaggal lehetséges. Az ilyen úton történő termékenyítést már 35-40%-os élősejtszámmal rendelkező termékenyítő anyaggal eredményesen lehet végezni, azonban a termékenyítő katéterrel elvégzendő cervikouterinális termékenyítéshez végzett eredményes termékenyítéshez már 60-65%-os élősejtszámmal rendelkező termékenyítő anyagra van szükség. Ennek előállítása pedig nagyon bonyolult feladat. A mélyhűtés során elég, ha a rendszerbe egy apró hiba kerül, s az egész napi munka kárba vész. A mélyhűtött termékenyítőanyag előállítása során oda kell figyelni a hígító pontos összetételére, a megfelelő mennyiségére, hogy az előhűtés több lépésben történjen, a krioprotektív anyagot tartalmazó hígító hozzáadására, az equilibráltatási idő betartására, a mélyhűtés sebességére, illetve megfelelő hőmérsékleten és megfelelő összetételű oldatokban történő visszamelegítésre. Azonban a spermiumok termékenyítő képessége nemcsak az élősejtszámtól függ. Ugyanis sok esetben az élő jól mozgó sejtek is átestek már az ún. kapacitációszerű elváltozásokon, illetve akroszóma reakción, amelyek idő előtti bekövetkezése alkalmatlanná teszi őket a termékenyítésre. Azonban

nem szabad elfelejtenünk azt sem, hogy ezek végbemenetele elengedhetetlenül szükséges a termékenyítéshez.

Disszertációm elkészítése során végzett vizsgálatok során ezen az elváltozásokat CTC (klór-tetraciklin-hidrokloridos fluoreszcens festési eljárással vizsgáltam. Így a vizsgált minták esetében kiválóan elkülöníthető volt az ép membránnal rendelkező, kapacitációszerű elváltozáson és akroszóma-reakción átesett sejtek aránya. Ezáltal meghatározhatóvá válik, hogy a mélyhűtés mely fázisában történik a spermiumsejtek károsodása és mely lépések azok, ahol változtatni kell. A visszamelegítés során pedig egyértelműen kiderül, hogy mely összetételű visszamelegítő oldat az, amely a legalkalmasabb a mélyhűtés során bekövetkezett kapacitációszerű elváltozás visszafordítására, azaz a dekapacitációra. A fenti vizsgálatokon kívül a mélyhűtés után visszamelegített kossperma életképességének vizsgálata céljából inkubációs kísérletek (hőkimerítő próba) is elvégzésre kerültek.

A mélyhűtés módszereinek meghatározásán kívül rendkívül fontos még egy adott állományban a mélyhűtésre alkalmas ejakulátumot termelő megfelelő tenyészkosok nevelése, tartása, takarmányozása, ugratásra szoktatása, rendszeres tréningezése, és a levett termékenyítőanyag minőségének folyamatos ellenőrzése, eredmények rögzítése, hogy a vizsgálat során kiderüljön, mely egyedek szaporítóanyaga alkalmas mélyhűtésre. Figyelni kell továbbá azt is, hogy az őszi fő-, illetve a tavaszi pótszezonban is értékes termékenyítő anyagot ad e adott tenyészállat. Az eddigi tapasztalatok

szerint az állatok a késő őszi időszakban termelik a mélyhűtésre legalkalmasabb termékenyítő anyagot. A különböző összetételű visszamelegítő oldatok esetében a dekapacitáló hatás vizsgálta is elvégzésre került.

## **2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS**

### **2.1 A kosok szaporítóanyag termelésének szabályozása**

#### **2.1.1 A hím nemi működés hormonális szabályozása**

A here hormontermelése, valamint az itt folyó spermiogenezis folyamata a gonadotrop hormonok, az FSH és LH (vagy ICSH) szabályozása alatt áll. A hypothalamus kissejtes magcsoportjában termelődő releasing hormon (GN-RH) a vérárammal a hipofízisbe eljutva serkenti az FSH és az LH kiáramlását. Az FSH hatásait hímivarban a következőkben lehet összefoglalni: segíti a kanyarulatot csatornácskák szöveti differenciálódását, hat az itt folyó spermiogenezisre, elsősorban a mitotikus osztódások serkentése révén, fokozza a Sertoli-sejtekben az ABP képződését, valamint ugyanitt a tesztoszteronból történő ösztogénelőállítás.

Az LH az intersticiális Leydig-sejtekre hat, a cAMP mennyiségének emelésével fokozott tesztoszteron szekréciót indít meg. A tesztoszteron negatív feedback hatással gátolja a Gn-RH és az LH-kiáramlást. A visszajelző mechanizmusban szerepe van az inhibinnek, amely elsősorban az FSH termelését gátolja. A hormonok kölcsönhatását az alábbi ábra szemlélteti.

Hím állatokban is termelődik prolaktin, ennek szerepe azonban nem tisztázott. Ugyancsak nem ismert pontosan az oxitocin szerepe, valószínűleg segíti az ejakuláció folyamatát a simaizom kontrakció fokozásával. (Zomborszky, 2000)

### 2.1.2. Évszakahatás

Számos szerző foglalkozott már a szezonális, évszakhatás vizsgálatával a juh fajban. A nőivarú állatok esetében egyértelműen beszélhetünk fő- és pótszezonról, mivel a juh egy szezonálisan poliösztroszos állat. A főszézon az őszi, a pótszezon pedig a tavaszi időszak. Az anyajuhok ivarzását a nappalok rövidülése, illetve hosszabbodása váltja ki, hatást gyakorolva hormontermelésükre. A melatonin és ezzel összefüggésben álló ösztrogén hormon termelődése fokozódik, így megindul az anyajuhok és jerek ivarzási ciklusa. Egyes szerzők szerint a kosoknál is megfigyelhető a szezonális, ami a hormontermelés változásából adódik, így gyakorol hatást a spermiumok termelődésére. Sarlós (1999) szerint a fotoperiódus befolyásolja az abnormális sejtek számát. Ősszel a tenyészszezonban, amikor a nappali világítás hossza fokozatosan csökken, a deformált sejtek száma alacsonyabb, tavasszal nyáron magasabb.

Jól ismert, hogy a mérsékelt égövön legtöbb juh fajta szaporodási tevékenysége szezonhoz kötött, ősszel zajlik le és a nappali világosság változásával áll összefüggésben.

A szezonális inkább a nőnemű állatok szaporodására jellemző, de kétségtelen, hogy egyes fajták kosaiban is megállapítható.

A csökkenő nappali megvilágítás fokozza a spermatogenezist, ami a megváltozott vérmennyiséggel együtt a here tömegének növekedését, a fokozódó megvilágítás pedig tavasszal a here tömegének

csökkenését idézi elő. A here tömegének növekedése már a tenyészidény előtt, június-júliusban elkezdődik, tehát még részben a hosszabb nappalok idején.

A here tömegében jelentkező változásokat a csatornákban lévő csírasejtek számának ingadozása okozza. A szezonális változások a kanyarulatos csatornák keresztmetszetében és azok egész hosszában megfigyelhetők. Mindezek a változások a heréből kikerülő spermiumok számának változását idézik elő.

Ugyancsak évszakos ingadozást mutat a kosokban a hormonok mennyisége és vérszintje. Az LH szezonális változásában a legfontosabb az LH-kiáramlás frekvenciájának változása, ami februártól-júniusig nő, szeptembertől decemberig viszont csökken.

Mindez epizodikus LH-csúcs a tesztoszteron szekréció következményes növekedését idézi elő.

A kosok szezonálisával a déli féltekén található Ausztráliában is foglalkoztak. Ismaya (2003) szerint a nappalok hosszabbodása és a klimatikus viszonyok egyaránt hatást gyakorolnak a kosok spermatermelésére és a sperma minőségére. Ausztráliában a legrosszabb hónapok a spermatermelésre a januártól-márciusig terjedő időszak. Ez pedig azért van, mert ekkor és ezt megelőzően a legmagasabb a hőmérséklet és csapadékmennyiség, ebből következően pedig magas a levegő páratartalma, ami egyáltalán nem kedvez a spermiogenezisnek. Ismaya (2003) szerint a legjobb hónapok a júliustól decemberig terjedő időszak, ekkor ugyanis a nappalok

hosszabbodása gyakorol pozitív hatást a spermatermelésre. Meg kell azonban jegyeznünk, hogy a Magyarországon tartott állatok éppen az ellenkezőjére a nappalok rövidülésére reagálnak jobban, hiszen itt az őszi a főszézon. Ekkor jobb a sperma minősége, ahogy ezt az általunk végzett vizsgálat is egyértelműen igazolja.

Az őszi és tavaszi sperma minőségével Colas és Brice (1976) is foglalkozott. Ez azért is nagyon fontos, mert az ő mélyhűtési technológiájuk hasonlít a legjobban az általunk használthoz. Ők összehasonlításával igyekeznek vizsgálni az őszi és tavaszi kossperma mélyhűtésre való alkalmasságát annak érdekében, hogy az eredmények reálisan összehasonlíthatóak legyenek azzal igyekeztek kizárni az anyai szezonális hatását, hogy a különböző időszakokban termelt kosspermával ősszel és tavasszal egyaránt termékenyítettek, hisz tudjuk, hogy az őszi főszézonban az anyák nagyobb valószínűséggel termékenyülnek. Azonban ezen vizsgálat elemzésekor nem az anyák, hanem kizárólag a kosok szezonálisára vagyunk kíváncsiak, így ahhoz, hogy reális képet kapjunk, ki kell zárunk az anyajuh által befolyásolt tényezőket.



Maxwell (1980) szintén ezzel a témával foglalkozott. Az előbb említett kutatók eredményeit az alábbi összefoglaló táblázat mutatja:

Forrás	Higító	Mélyhűtés módja	Termékenyítő képesség	
			tavasszal vett sperma	ősszel vett sperma
Colas and Brice (1976)	laktóz-tojássárgája + INRA-glicerol	műszalama	41% (termékenyítés tavasszal)	57% (termékenyítés tavasszal)
			51% (termékenyítés ősszel)	
			60% (termékenyítés ősszel)	
Maxwell (1980)	Tris-glucose-tojássárgája	pellet	41,8% (termékenyítés ősszel)	37,5% (termékenyítés tavasszal)
átlag			48,45%	47,25%

*1. táblázat: Mélyhűtött tavaszi és őszi kossperma termékenyítő képessége Colas és Brice (1976) és Maxwell (1980) eredményei alapján*

Az eddig felsorolt kutatókon kívül Purdy (2006) szintén foglalkozott az évszakhatással. Vizsgálta a motilitást, a plazmamembrán integritását és az akroszóma reakción átesett, de még élő sejteket. Eredményeit az alábbi táblázat mutatja be:

P. H. Purdy (2006) szerint								
Kategóriák	Ősszel vett sperma				Tavasszal vett sperma			
	0 h	24 h	48 h	Átlag	0 h	24 h	48 h	Átlag
5°C-on inkubálja a mélyhűtés pelletizálás előtt								
Plazmamembrán integritása (%)	28	35	29	30,7	26	33	31	30
Akroszóma-reakción átesett élő sejtek aránya "AR" (%)	0,4	0,6	0,8	0,6	3,7	3,5	3,2	3,4
Élősejtszám (%)	29	31	36	32	21	25	20	22

*2. táblázat: 5°C-on különböző ideig inkubált őszi és tavaszi kossperma membránvizsgálatának és élősejtszámának eredményei Purdy (2006) eredményei alapján*

Pudry (2006) az élősejtszámot, a plazmamembrán integritását és az akroszóma-reakción átesett sejtek arányát vizsgálta. Az általa végzett mélyhűtés előtti 0, 24, 48 órás inkubálás 5°C-on történt. Hasonló előhűtést mi is végeztünk, de az általa végzett 24-, illetve 48 órás időtartam túl hosszú inkubációs időszak a mélyhűtés előtt. Pudry (2006) vizsgálatainkhoz hasonlóan szintén külön-külön vizsgálta az őszi, illetve tavaszi szaporítóanyagok közti különbséget.

López-Brea és munkatárai (1996) Spanyolországban vizsgálták a Manchego kosbárányok ejakulátumának tulajdonságait melatonin implantátum beültetés után és implantátum beültetés nélkül, kiküszöbölve ezzel az évszakhatást, de mégis bizonyítva azt, mivel a fény mennyiség változása hat az állatok melatonin termelésére. Ha megváltozik a fény mennyisége ennek szintje is megváltozik. A vizsgálatok eredményéből látszik, hogy a melatoninnal kezelt állatok spermájánál, nagyobb az ejakulátumonkénti összes spermiumszám ( $4 \times 10^9$  helyett  $4,6 \times 10^9$ ), az élő és jól mozgó sejtek aránya és az érintetlen akroszómával rendelkező sejtek is nagyobb arányban fordulnak elő. Ez igazolja a melatonin hatását a spermiumtermelésre. Azt azonban meg kell jegyeznünk, hogy az eredményekben nem túl nagy az eltérés, az ejakulátumonkénti spermiumszámot kivéve.

López-Brea és mtsai. (1996)			
kezelés	Élősejtszám (%)	Érintetlen acrosoma	Akroszóma -reakción átesett
		„F”+”B” kategória	„AR” kategória
		(%)	(%)
melatoninnal implantált kosok spermájában esetében	80,9	84,3	15,7
kontrol	80,1	79,1	20,9

3. táblázat: Melatoninnal kezelt- és nem kezelt kosok spermájának élősejtszáma, akroszóma-reakción átesett és érintetlen akroszómájú sejtek aránya Lopez-Brea et. al. (1996) eredményei alapján

Lopez-Brea (1996) melatoninnal kezelt mintákban, illetve kezeletlen kontrol mintákban vizsgálták az élősejtszámot, az akroszóma -reakción átesett, illetve érintetlen akroszómával rendelkező sejtek arányát. A melatonin ez esetben az évszakhatáshoz hasonló hatást hivatott kiváltani. Az akroszóma-reakción átesett sejtek aránya összehasonlítható az általunk vizsgált eredményekkel. Az általunk vizsgált dekapacitáció meghatározásához elengedhetetlenül szükséges kapacitációszerű változáson átesett sejtek arányára vonatkozó adatot azonban az általuk publikált vizsgálatok között nem szerepel.

## 2.2. Spermiumok felépítése és életjelenségei

### 2.2.1. Ejakulátum

Ejakuláció során a mellékheréből az ondósejtek az ondóvezetőbe jutnak, ott keverednek a járulékos nemi mirigyek váladékával, az ondóplazmával és kialakul az ondó (semen). Az ondóban az ondóplazmával való keveredés hatására megindul a sejtek mozgása és felgyorsul anyagcseréjük. Az ondó tehát nemcsak hordozza, hígítja a spermiumokat, hanem olyan anyagokat is tartalmaz, amelyek nélkülözhetetlenek az ondósejtek életben maradásához, életjelenségeihez. Tápanyaga főként fruktóz, amely leginkább az ondóhólyagból származik, de tartalmaz tejsavat, citromsavat, szorbitot, inozitot, aminosavakat, zsírokat is. Ugyancsak az ondóhólyag termel ergotionint, amely védelmet nyújt az oxidatív és toxikus hatásokkal szemben. Hasonló szerepet tulajdonítanak az ondó aszkorbinsav tartalmának is.

Jelentős az ondóhólyag prosztaglandin termelése is, ennek szerepe párzásakor, a nemi utak simaizomzatának összehúzódásában van.

A prosztata váladéka gazdag hidrolitikus enzimekben gazdag (foszfatáz, glükuronidáz, proteolitikus enzimek, AST stb.), tartalmaz ezeken kívül ásványi anyagokat, citromsavat, valamint spermium-agglutinint.

## 4. táblázat: Néhány adat az egyes állatfajok ejakulátumairól

Faj	Az ejakulátum		
	menyisége (mL)	spermiumok száma/ $\mu$ L	pH-ja
Bika	4–8	1 000 000	6,2–6,8
Kos	0,5–2	2 500 000	6,2–6,8
Mén	30–200	100 000	7,2–7,8
Sertés kan	154–500	100 000	7,2–7,6
Kan kutya	2–15	200 000	6,6–6,8
Baknyúl	0,3–1,5	700 000	6,6–7,5
Kakas	0,2–1,5	4 000 000	6,3–7,8

(Zomborszky, 2000)

A Cowper-féle mirigy főleg mucindús váladékot termel.

A járulékos nemi mirigyek kifejlődését, váladéktermelését a tesztoszteron szabályozza. Az egy ejakulációval ürített ondó mennyisége és annak sűrűsége állatfajonként meglehetősen nagy eltérést mutat. A kérődzőknél kevés sűrű ondó ürül.

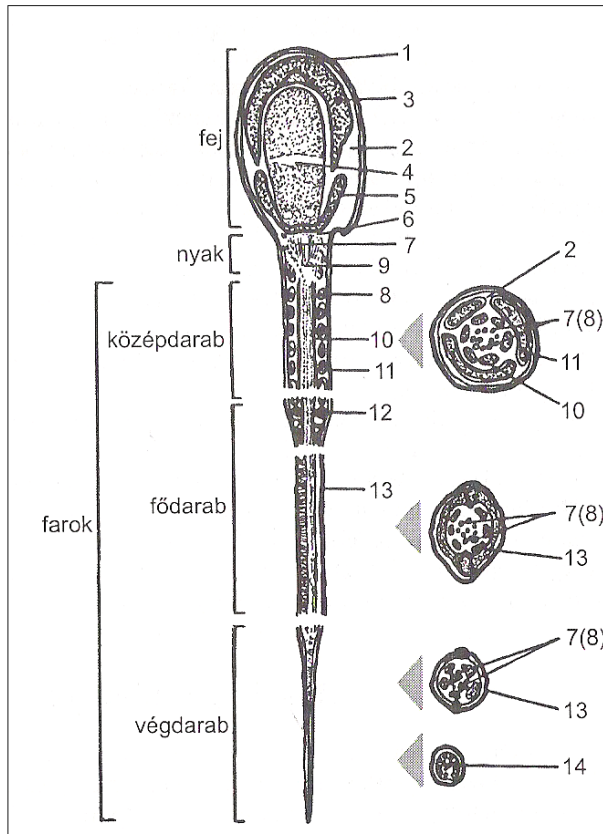
## 5. táblázat: A spermium fontosabb értékmérő tulajdonságai

Mennyiség (mL)	Spermatokrit (%)
Szag	Metilénkék-redukció (min.)
Szín	Fruktóztartalom (mg %)
Állag	Katalázaktivitás
pH-érték	Ép spermiumok (%)
Tömegmozgás	Torz spermiumok(%)
Sejtmozgás	
Élő/holt sejtek (%)	
Sűrűség/mL	

(Zomborszky, 2000)

### **2.2.2. A spermiumsejt**

Az ondósejtek plazmamembránja nem egységes, az egyes spermiumszubdoméneket borító membránok szerkezete és élettani funkciója eltérő (Anmann és Graham, 1993). A spermiumokra két-egyértelmű – makrodomén, a fej és a fark jellemző. Ezek további szubdoménekre oszthatók: a fejen találjuk az akroszómális régiót, az ekvatoriális zónát, illetve a posztakroszómális régiót, a fark pedig középdarabra és fődarabra osztható. Az egyes alrégiók membránját olyan strukturális elemek választják el, mint a nyaki gyűrű, a fej és a középdarab, illetve az annulus, vagy Jensen-gyűrű a közép- és fődarab között (Ladha és mtsai, 1997).

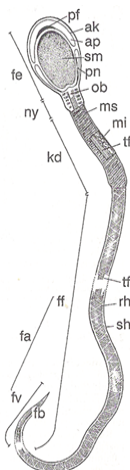


**1. ábra: Az ondósejt szerkezete - Becze (1983)**

1. sejthártya, 2. citoplazma, 3. akroszóma, 4. ekvatoriális zóna,  
 5. postnuklearis sapka, 6. basalis lemez, 7 centriolumok és belőlük  
 eredő 2+9 rost (belső rostos hüvely), 8. filamentumok,  
 9. nyaklemezek, 10. külső rostos hüvely,  
 11. spirális- (mitokondrium) hüvely, 12 Jensen-féle zárógyűrű  
 (középdarab vége), 13 spirális hüvely,  
 14. kifejezetten struktúra nélküli rész

### 2.2.3. Spermium morfológiája és életjelenségei

A spermium feji, nyaki és farki részéből álló, sejthártyával határolt sejt. A fej legnagyobb részét a genetikai állományt tartalmazó sejtmag tölti ki. Apicalis végében az acrosoma (vagy fejsapka) található, amely enzimeket (hialuronidáz, akrozin, hidrolázok) tartalmazó sejthártyakettőzet. Membránja belső felületén a perforatórium helyeződik. A sejtmag és a nyaki rész között húzódik a postnucleáris sapka. A fejet a bazális lemez zárja le.



2. ábra: Spermiumsejt (Kiss, 1995)

**ak:** akroszónma, **ap:** apikális vakuólum, **fa:** farok, **fb:** felbomló szerkezetű végfonál, **fe:** fej, **ff:** farokfőrész, **fv:** farokvégrész, **kd:** középdarab, **mi:** mitokondrium, **ms:** mitokondrium- spirál, **ny:**nyak, **ob:** ostor bazális teste, **pf:** perforatórium, **pn:** poszt nukleáris sapka, **rh:** egymást keresztező rostokból álló hüvely, **sh:** sejthártya, **sm:** sejtmag, **tf:** tengelyfonál



A nyak kapcsolja össze a fejet a farokkal, benne helyeződik el a két centriolum, ezek a mozgás központi szervecskéi. A farokban halad végig a két központi és az azokat hüvelyszerűen körülvevő kilenc körkörös tengelyfonál, amelyet egy spirális rostos hüvely vesz körül. A kontraktilis tengelyfonalak aktív összehúzódásának következménye a spermiumok mozgása. A rostokat kívülről egy mitokondriális hüvely övezi, amely a mitokondriumok spirális, láncszerű elrendeződés. A farok fő- és végdarabjának határában véget ér a spirális rostos hüvely, a végdarabban csupán két központi tengelyfonál halad kevés citoplazmával körülvéve.

A spermiumok életjelenségei közül kiemelkedik és egyben azok termékenyítőképességének feltétele a mozgás. Az előreheledő mozgás a női nemi utakban speciális kémiai környezetben, mindig a folyadék áramlásával szemben (pozitív reotaxis) figyelhető meg. Az ondósejtek aggregációját elektromos töltésük (fejen pozitív, farki részen negatív) akadályozza meg. A spermiumok mozgásukhoz szükséges energiát a környezet  $O_2$  -tartalmától függően aerob, illetve anaerob úton nyerik. Fő energiaforrásuk az ondófolyadék fruktóztartalma, energiatároló vegyületük az ATP és kreatinfoszfát. Anyagcseréjük intenzitásának meghatározására az ún. fruktóz-index (FI), vagy metilénkék-redukciós próba szolgál.

#### **2.2.4. A spermiumok utóérése**

A spermiumok a here turgorának köszönhetően, a hemilimfában úszva, kb. 10 nap alatt eljutnak a mellékherébe, ahol végbemegy

utóérésük és ahol inaktívan tárolódnak. Majd az ondóvezetőben a spermiumok elnyerik aktív mozgásképesységüket. A folyamat állatfajoktól függően 1-2 hónapig tart. Az érést morfológiai jelek kísérik az akroszóma mérete csökken (akroszóma redukció), a sejtmag teljes mértékben kondenzálódik, eltűnnek a citoplazmacseppek. Az itt tartózkodás alatt a spermiumok abiotikus állapotban vannak mozdulatlanok, anyagcseréjük minimális anaerob jellegű. Ennek az oka többek között az energianyerésre felhasználható anyagok kisebb mennyisége, az alacsonyabb pH érték, az alacsonyabb  $O_2$ -, viszont magasabb  $CO_2$ - és K-ionkoncentráció, nagyobb ozmotikus nyomás, a magas glicerín-foszforilkolin (GPC) tartalom.

A mellékhere farki vége felé haladva a herelimfa nagy része fokozatosan felszívódik, besűrűsödik. A farkban a mellékhere váladékával keveredve raktározódik a spermium 80%-a. Ejakuláció hiányában az ondósejtek egy idő után elhalnak, és kiürülnek a vizelettel, esetleg felszívódnak.

Az utóérés folyamatával még nem fejeződik be a spermiumok változása, más tulajdonságait figyelhetjük meg az ejakulátumba és a női nemi utakba került spermiumoknak.

### **2.2.5. Spermiumtranszport**

A spermiumok a hüvelybe, vagy a nyakcsatornába kerülve aktív mozgással elindulnak a petevezető irányába. Előrehaladó mozgásukat az alábbi tényezők segítik:

-kedvezőtlen környezet (savas pH) a hüvelyben, ahonnan elkerülni igyekeznek,

-a női nemi utak antiperisztaltikája, amely ösztrogén hatására fokozódik, ugyancsak ez irányban hat az ondó prosztaglandintartalma is,

-az ivarzási nyálka (méhnyák) mukopoliszacharidjainak fonalas szerkezete utat készít a spermiumoknak, amelyben pozitív rheotaxis érvényesülésével haladnak.

### **2.2.6. A spermiumok érési átalakulása a női nemi utakban**

A spermiumok tényleges termékenyítőképességüket csak a női nemi utakban nyerik el, ahol is pontosan még meg nem határozott átalakuláson, a kapacitáción mennek keresztül. A kapacitáció meginduláshoz a női nemi utakból származó impulzusokra (albuminok, glükoproteinek, corona radiata sejtjei) van szükség. Hatásukra fokozódik a spermiumok mozgása, az anyagcsere intenzívebbé válik, ezt jelzi a megnövekedett oxigénfogyasztás és egy emelkedett adenilcikláz-aktivitás. A sejten belüli biokémiai változások mozgatórugója a feltételezések szerint az erősen megnövekedett Ca-ion beáramlás. Megváltozik a Ca-ion beáramlás. Megváltozik a

sejtmembrán felületi szerkezete is, bizonyos antigén hatású glikoproteinek leválnak, és ugyancsak a Ca-ionnak köszönhetően megváltozik a sejtmembrán foszfolipid összetétele. Ez a membrán feltöredezéséhez vezet, meindul az akroszóma-reakció. Az akroszóma membránjának felnyílásakor kiszabadulnak a benne lévő enzimek (akrozin, savanyú hidrolázok, hialuronidáz stb.). Ekkor válik a spermium alkalmassá a megtermékenyítésre, azaz a petesejt burkainak leoldására, a fúzióra és penetrációra. a kapacitációhoz kb. 6 órára van szükség, a spermiumok a női nemi utakban 1-3 napig (juhban 20-48 óra) megőrzik termékenyítőképességüket.

### **2.2.7. A termékenyülés**

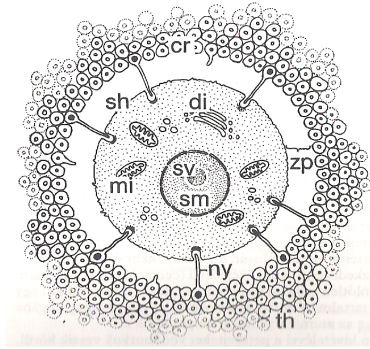
A kapacitáción és az akroszóma-reakción átesett ondósejtek feljutnak az ovulációkor a petevezetőbe került másodrendű oocitához, amelyet a zona pelucida és a corona radiata övez. A petesejt perceken belül eljut az ampullába, mozgásban a nyálkahártya hámrétegeinek csillói segítik. Itt 12, max 24 órán keresztül őrzik meg termékenyülőképességüket, majd előregednek. Az ampullában végbemenő termékenyülés többlépcsős folyamat eredménye. Az akrosomából kiszabaduló enzimek fellazítják a corona radiata sejtjei közötti kapcsolatot, valamint a zona pellucida alapállományát és a spermium eléri a petesejt membránját. A női- és hímvarsejt membránjának fúziójával a petesejt membránjában végbemenő változásokat az akroszóma-reakcióhoz hasonlóan a Ca-ionok beáramlására vezetik vissza.

Amikor ugyanis a spermium megsérti a petesejt membránját, a membrán depolarizálódik. Ennek hatására Ca-ionok áramlanak ki a sejtszervecskékből, ezek pedig a petesejt membránja alatti cortikális vezikulumok membránját átjárhatóvá teszik (cortikális reakció). A spermium nyaki részen kapcsolódik a petesejthez, itt áramlik be a maganyag, a genetikai állomány a petesejtbe, míg a farki rész a zona pellucidában marad.

A cortikális reakció után a cortikális vesiculumból kiszabaduló peroxidok hatására a zona pellucida anyaga polimerizálódik (zona-reakció), kialakult egy átjárhatatlan réteg a zigóta körül (termékenyülési membrán), amely megakadályozza a polyspermiát, azaz a további spermiumok bejutását.

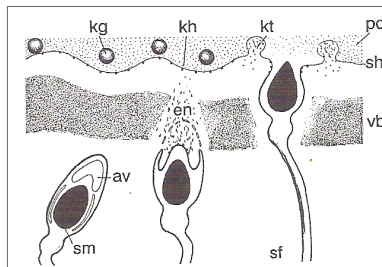
A megtermékenyítés 6-24 órát vesz igénybe. Ez alatt befejeződik az oocita meiotikus osztódása, a polocyta kiválása, a maganyagok egyesülnek, kialakul a diolpid kromoszómaállományú zigóta.

Mindezek a folyamatok nagyon gyors egymásutániségben történnek meg, és ha bármilyen zavaró tényező lép fel, a legkülönbözőbb problémákat idézheti elő (pl. polyspermia, rendellenes kromoszómaállomány kialakulása).



3. ábra: Petesejt

cr: corona radiata, di: diktioszóma, mi: mitokondrium, ny: tüszőhámsejtek nyúlványa, sh: sejthártya, sm: sejtmag, sv: sejtmagvacska, th: tüszőhámsejtek, zp: zona pellucida  
(Törő – Csaba, Kovács – Fehér nyomán módosítva, 1989)



4. ábra: Akroszóma-reakció

af: aktinfilamentumok, ap: apikális vakuólum, en: enzim, kg: körtikális granulum, kh: kötőhelyek, kt: körtikális granulum kiömlő tartalma, pc: petesejt citoplazmája, sf: spermium farki részének kezdeti szakasza, sh: petesejt sejthártyája, sm: spermium sejtmagja, vb: védőburkolat a petesejt körül  
(Jungerman- Möhler és Darnell nyomán módosítva)  
(Bakonyi, 1995)

A mesterséges termékenyítés és a természetes pároztatás időpontjának megválasztásakor is fontos tudnunk, hogy mikorra várható az ovuláció. Tudjuk az ondósejtek tovább életképesek, idő szükséges a kapacitációhoz, ugyanakkor a petesejt rövidebb idő alatt elveszíti termékenyülőképességét. Ezért kedvező az, hogy a kapacitált ondósejtek már az ampullában várják az ovuláló petesejtet.

### **2.3. Mesterséges termékenyítésre alkalmas kossperma minőségi paraméterei**

A mesterséges termékenyítés eredményességének alapfeltétele a jó minőségű sperma. A rutin vizsgálatok során a sperma koncentrációját, a mozgó sejtek arányát, illetve a spermiumok morfológiáját bírálják. Az egyes értékelési eredmények és termékenyítési eredmények között azonban nem található minden esetben szoros kapcsolat. A termékenyítés összetett biológiai folyamat megköveteli a sperma több tulajdonságának egyidejű kombinált vizsgálatát. (Nagy, 2002)

Anmann és Graham szerint (1993) a mesterséges termékenyítés sikerének alapfeltétele a jó minőségű termékenyítő anyag használata. A ondósejtek küldetésük, a genetikai anyag célba juttatása érdekében a legalább következő tulajdonságokkal kell bírniuk: megfelelő anyagcsere az energiatermelés érdekében, progresszív motilitás, megfelelő membránszerkezet, az akroszóma enzimek, valamint normális morfológia.

Az akroszóma épségének vizsgálata szintén fontos a sperma minőségének megállapítására, különösen mélyhűtött/felolvasztott minták esetében, mivel a fagyasztás és felolvasztás folyamata a kapacitációhoz hasonló élettani változásokat idéz elő (Watson, 1995)

6. táblázat: *Koszsperma minőségi paraméterei (Cseh, 2000)*

<b>A KOS ONDÓ SPERMIMUM KONCENTRÁCIÓJÁNAK BECSLÉSE A KONZISZTENCIA ALAPJÁN (Hafez, 2000)</b>			
<b>Spermiumszám (X 10<sup>9</sup>)</b>			
<b>Érték</b>	<b>Konzisztencia</b>	<b>Átlag</b>	<b>Tartomány</b>
5	Sűrű tejszínszerű	5.0	4.5 – 6.0
4	Tejszínszerű	4.0	3.5 – 4.5
3	Híg tejszínszerű	3.0	2.5 – 3.5
2	Tejszerű	2.0	1.0 – 2.5
1	Felhős	0.7	0.3 – 1.0
0	Tiszta (vízszerű)	-	-

7. táblázat: *A spermiumok hullámszerű tömegmozgásának értékelése (Hafez, 2000)*

<b>A SPERMIMUMOK HULLÁMSZERŰ TÖMEGMOZGÁSÁNAK ÉRTÉKELÉSE (Hafez, 2000)</b>	
<b>Értékszám</b>	<b>A tömegmozgás megjelenése</b>
0	Nincs mozgás/nincs tömegmozgás
1	Elszórta néhány mozgó spermium/egyedi mozgás
2	Nagyon lassú tömegmozgás
3	Hullámszerű tömegmozgás, alacsony amplitúdójú hullámokkal
4	Gyors, hullámszerű tömegmozgás, nincs örvénylés
5	Gyors, hullámszerű tömegmozgás, van örvénylés



8. táblázat: A háziállatok és az ember spermájának jellemzői  
(Arthur és mtsai, 2000; Roberts, 1986; Morrow, 1986)

Paraméterek	Fajok					
	Bika	Kos	Mén	Sertés	Kutya	Ember
Térfogat (ml)	4 (2-10)	1 (0,5-2,0)	60 (30-250)	250 (125-500)	10 (2-19)	3 (2-6)
Ejakuláció típusa	NF	NF	F	F	F	NF
Koncentráció (X10 <sup>6</sup> /ml)	1250 600-2800	2000 1500-5000	120 30-600	100 25-1000	125 20-540	30 20-80
Mozgás (mozgó sejtek %)	> 70	> 80	> 60	> 60	> 80	> 50
Morfológia (normális sejtek %)	> 80	> 80	> 60	> 60	> 80	> 30

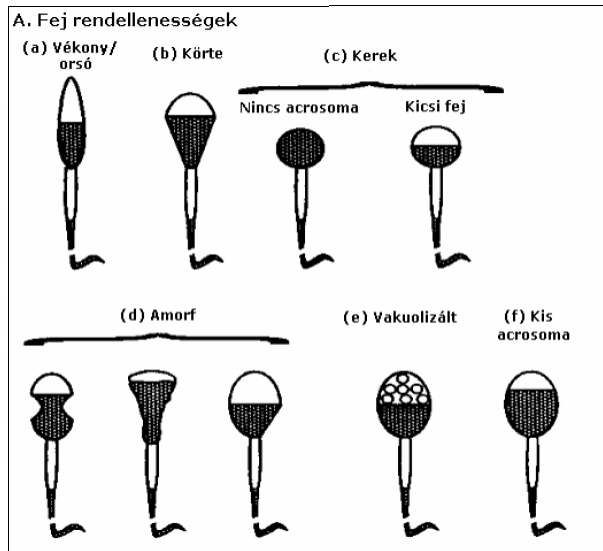
NF = nem frakcionált; F = frakcionált

### Morfológiai hibák

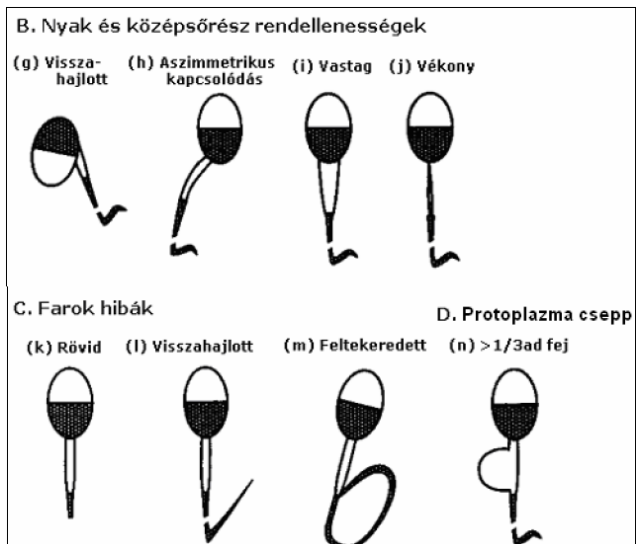
9. táblázat: Elsődleges másodlagos spermium rendellenességek  
(Cseh, 2000)

ELSŐDLEGES ÉS MÁSODLAGOS SPERMIMUM RENDELLENESÉGEK	
Elsődleges rendellenességek	Másodlagos rendellenességek
Fej (bármilyen eltérés)	Levált normális fej és farok
Középső rész	Levált acrosoma
Abaxiális (aszimmetrikus) felkapcsolódás (kivétel mén, ha néhány százalékban van jelen ilyen spermium)	Visszahajlott farok
Kettős középső rész	Disztális citoplazma/protoplazma csepp
Vékony középső rész	
Megvastagodott középső rész	
Törött középső rész; Visszahajlott középső rész	
Proximális citoplazma/protoplazma csepp	
Farok	
Feltekeredett farok	
Több farok	

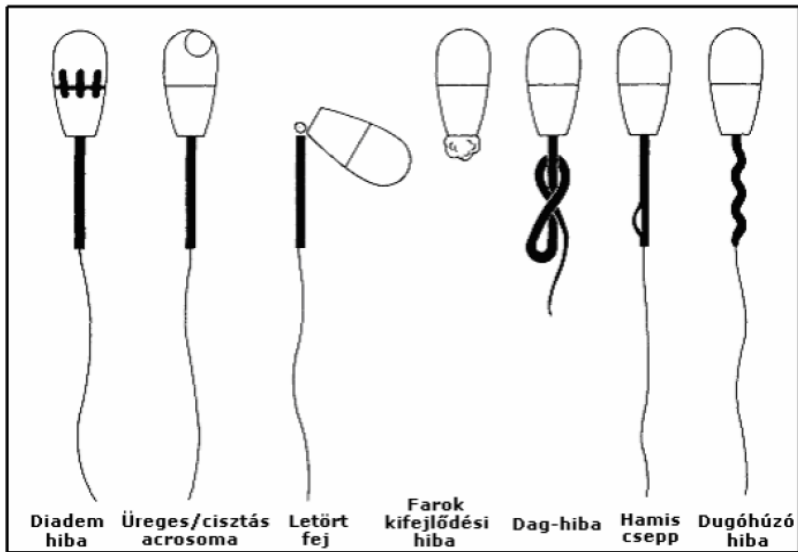
5. ábra: Fej rendellenességek (Cseh, 2000)



6. ábra: Nyak középrész rendellenességek és fark hibák (Cseh, 2000)



7. ábra: Egyéb hibák ábrázolása és elnevezései (Cseh, 2000)



10. táblázat: Sperma analízisben használt elnevezések

A SPERMA ANALÍZISBEN HASZNÁLT ELNEVEZÉSEK		
Tulajdonság	Eredmény	Elnevezés
Térfogat	Nincs	Aspermia
	Csökkent	Hypospermia
	Megnőtt	Hyperspermia
Spermium koncentráció	Nincs	Azoospermia
	Csökkent	Oligozoospermia
	Normális	Normozoospermia
	Megnőtt	Polyzoospermia
Motilitás	Csökkent	Asthenozoospermia
Életképesség	Nincs élő spermium	Necrozoospermia
Abnormális spermium	Nagy arányban	Teratozoospermia

(Cseh, 2000)

## **2.4. Kossperma minőségének ellenőrzése**

### **2.4.1. Spermaminőség és fertilitás**

Cseh (2009/c) szerint szoros kapcsolat van a hagyományos értelemben vett spermaminőség (koncentráció, motilitás) morfológia és termékenyítőképesség között. A koncentráció, a motilitás, a morfológia értékelése ellenőrzése fontos része a spermaminőség bírálatának. A spermiumok motilitása lényeges tulajdonság a termékenyülés szempontjából in vitro és in vivo környezetben egyaránt. A legújabb vizsgálatok szerint több funkciós teszt és a fertilitás, termékenység között kapcsolat van.

### **2.4.2. Spermaminőség vizsgálatának módszerei**

Az ejakulátumok/sperma laboratóriumi vizsgálata

- Makroszkópos vizsgálat
- Mikroszkópos vizsgálat
- Mikrobiológiai vizsgálat
- Egyéb vizsgálatok (Funkciós biokémiai tesztek) (Cseh, 2009/c)

#### **Makroszkópos vizsgálat**

- Térfogat:** kosnál 1-2 ml
- Szag:** Van e a normálistól eltérő különösen penetráns szaga.
- pH:** Normális 6,5 – 7,5

•**Szín:** normális szín szürkés-fehér, sárgás-fehér, tejfehér, nem áttetsző opálos.

•**Viszkózitás:** Vaginálisan ejakuláló állatok esetében tejszínszerű állag. (Cseh, 2009/c)

### **Mikroszkópos vizsgálat**

•**Koncentráció**

•**Motilitás**

•**Élő/elhalt sejtek aránya**

•**Morfológia**

•**Spermiumon kívüli egyéb sejt elemek (Cseh, 2009/c)**

### **Mikroszkópos vizsgálatok**

A spermaminőség ellenőrzése különböző festési eljárásokkal lehetséges. A festési eljárások vizsgálata a használt festéktől függően történhet fénymikroszkópos és fluoreszcens fényforrással felszerelt mikroszkóppal. A fénymikroszkópos vizsgálat élő, festetlen mintákban tömegmozgás, sűrűség és élősejtszám meghatározására is alkalmas. A mélyhűtés, vagy a hígított folyékony szaporítóanyag hűtött formában történő felhasználása előtt a gyakorlatban ezt mindig meg is teszik a szaporítóanyag mélyhűtésre, illetve közvetlen termékenyítésre való alkalmasságának meghatározása érdekében.

A Kovács és Foote (1992) féle festési eljárás során egy jóval egyszerűbb festési módszert alkalmaznak. Tripánkék, neutrálvörös és

Giemsza kombinációjával a plazmamembrán, illetve az akroszóma állapotától függően tíz kategóriát állapítottak meg, ebből rutin körülmények között hat kategóriát érdemes vizsgálni. A Kovács és Foote, 1992 féle festés az élő és elhalt sejtek megkülönböztetéséhez a fej hátulsó, az akroszóma épségétől annak elülső része ad információt: Élő: világos (fehér-halvány rózsaszín); Elhalt: sötét (fekete- ibolyaszín – szürke); Akroszóma. Ép: bíborvörös; Fellazult: sötét levendula; Sérült: világos levendula; Nincs: világos apikális rész; A festett farki részű ondósejtek immotilisak.

Előnyös, ha az akroszóma értékelésekor egyidejűleg az élő/elhalt állapotot is értékeljük, így különbséget tudunk tenni a tényleges és „fals” akroszóma-reakció között („fals” akroszóma-reakciónak tekintjük a sejthalál során-, vagy után bekövetkező degeneratív membránváltozást.) (Nagy, 2002)

A fénymikroszkópos vizsgálatok előnye, hogy nem igényelnek drága műszereket, azonban egyes festékek kötődését zavarhatják a spermahígítóban található olyan anyagok, mint például a glicerin vagy a tojássárgája (Mixner és Saroff, 1950) Fluoreszcens festékek alkalmazásával ez elkerülhető, és ezekkel a festékekkel átlátszatlan közegekben is értékelhetőek a spermiumok. (VanDemark és mtsai, 1959) Klór-tetraciklin (CTC) segítségével a kapacitáció stádiuma is értékelhető (Gillian és mtsai, 1997).

## **2.5. Spermiumsejtek mélyhűtése**

A mélyhűtés az ivarsejtekben zajló folyamatokat átmenetileg szünetelteti. A hatékony mélyhűtési technológia kialakítása elősegíti az asszisztált reprodukciós technikák alkalmazását, a gyorsabb genetikai előrehaladást az állattenyésztésben, valamint lehetővé teszi a különleges genetikai, biológiai anyag ritka fajok, fajták genetikai anyagának tartós tárolását, megőrzését. (Cseh, 2009/b)

Az ivarsejtek és embriók mélyhűtésének gyakorlati előnyei a genetikai anyag termékenyítési szempontból előnyös tulajdonságainak cseréje egymástól távol eső kontinensek, országok, farmok között. (Cseh, 2009/b)

### **2.5.1. A modern kori kriobiológia kezdete/első eredményei**

A glicerín védőhatását Chris Polge és mtsai 1949-ben publikálták először. 1972-ben Willadsen és munkatársai publikálták az ún. „rövid protokoll”-t. Faly és mtsai. 1984-ben számos mélyhűtési protokollt fejlesztettek ki és több emlős faj ivarsejtjét, embrióját fagyasztották sikeresen vitrifikációs eljárással, beleértve emberét is.

### **2.5.2. Az ivarsejtek/embriók mélyhűtésének elméleti alapjai**

Cseh 2009/b szerint a sejt ozmotikus reakciója/amikor behelyezzük az intracelluláris krioprotektív anyagot tartalmazó fagyasztó oldatba. A fagyasztó oldat koncentrációjának növelése, amikor elkezdjük a

hőmérséklet csökkentését és megkezdődik a vízmolekulák kilépése az oldatból a jégkristályok képződése, növekedése extracellulárisan. A sejt ozmotikus vízvesztése, dehidratációja, az extracelluláris terület koncentrációjának emelkedése.

### **2.5.2.1. A sejtek túlélését meghatározó tényezők**

- Hűtési sebesség
- Tárolási hőmérséklet, és tárolás alatti kezelés (körültekintő, biztonságos)
- Felmelegítési sebesség
- A sejt ozmotikus válasza a krioprotektív anyag kivonása (rehidratálás) (Cseh, 2009/b)

### **2.5.2.2. Az ivarsejtek/embriók mélyhűtési technológiájának lépései**

Első fázis: előkészítés és hűtés

- A sejtek gyűjtése és minősítése
- A sejtek equilibrálása a krioprotektív anyagot tartalmazó fagyasztó oldatban
- A sejtek hűtése a LN<sub>2</sub> hőmérséklete (-196 °C)

Második fázis: Tárolás a LN<sub>2</sub> hőmérsékleten (-196 °C)

Harmadik fázis: Felmelegítés és előkészítés a felhasználásra.

- A sejtek felmelegítése ellenőrzött körülmények között.



- A krioprotektív anyagok kivonása a sejtekből.
- Visszatérés a fiziológiai körülményekhez, állapotokhoz.

### **2.5.2.2.1. Mélyhűtés típusai**

#### **Equilibrium hűtés**

A krioprotektív anyag alacsony koncentrációban van jelen

( $C < 10\%$ ; 1,5 M)

Lassú sebességgel hűtünk ( $0,3^{\circ}\text{C} - 2,0^{\circ}\text{C}/\text{min}$ )

#### **Nem equilibrium hűtés**

Több krioprotektív anyag és nagy koncentrációban van jelen ( $> 40\%$ ; 6-8M)

Rövid equilibráltatási idő

Nagy sebességgel hűtünk ( $>500^{\circ}\text{C}/\text{perc}$ ;  $15.000^{\circ}\text{C}/\text{perc}$ ) (Cseh, 2009/b)

### **2.5.3. Kossperma mélyhűtés szakirodalomban publikált módszerei**

#### **2.5.3.1. Mélyhűtés módszere (hígítás, előhűtés, kiszerezés)**

Salamon István két 1997-ben megjelent cikkében foglalta össze a mélyhűtött kosspermával foglalkozó kutatók hígítási és mélyhűtési módszereit, valamint termékenyítési eredményeit. Az általunk használt hígítókhoz Colas és Brice (1975b) hígítójának összetétele

hasonlít a legjobban, igaz ők nem pelletben, hanem műszalmában mélyhűtöttek. Az általuk használt úgynevezett I-es számú hígító laktózt és tojássárgáját, a II-es számú hígító laktózt, tojássárgáját és 4 % glicerint is tartalmazott. Ez utóbbit krioprotektív anyagként használta. 4 °C-on adták hozzá a II-es hígítót. Hígítási aránynak 1:4 – es arányt ajánl Brice (1975 a). A Pharmagene-Farm Kft.-nél végzett vizsgálatok során is ehhez hasonló 1:5-höz hígítási arányt alkalmaztunk. (A hígítási arány a különböző sűrűségű ejakulátumok esetén eltérő volt.)

Salamon (1997) szerint a hűtési sebesség a megfelelő glicerín koncentráció beállításához szükséges, melyet a II-es hígító tartalmaz.

Watson és Martin (1974) szerint a glicerín optimális koncentrációja a tojássárgája koncentrációtól is függ. Ha a tojássárgája koncentrációt növeljük, a glicerol koncentrációt csökkenthetjük.

Az ezzel a témával foglalkozó legtöbb kutató Feredean és Bragan (1964), Colas (1975a), Graham et. al. (1978), Fisher és Fairfull (1989) és Menger (1981) a 4-5°C-on való hozzáadást találta a legalkalmasabbnak, de vannak olyan kutatók is, mint például Blackshaw (1960/a,b), aki kezdetben 29-5°C közt kisebb adagokban adta hozzá a glicerint a hígított spermához, végül ő is úgy találta, hogy az 5°C –on történőhozzáadás a legoptimálisabb.

Colas és Brice (1975) szerint a termékenyítés jobb lett a 4°C-on hozzáadott glicerinnel készült hígító esetén, mint a 30°C-on hozzáadott hígító esetében.

Colas (1975a) szerint 4%-os glicerin koncentráció esetén kisebb a károsodás, ha a hozzáadás 0 °C-on történik.

Salamon (1997), miután cikkében összefoglalt kutatási eredmények alapján a legmagasabb élősejtszámot akkor tapasztalta a visszamelegítés után, ha 4-5%-os glicerin koncentrációjú hígítót használtak, a hűtési sebesség pedig 1-100°C min<sup>-1</sup> között volt.

Az általunk használt hígító összetételéhez leginkább hasonlító hígítót Colas és Brice (1976) használta, azonban ők műszalmában mélyhűtöttek, amely eltérő eredményeket mutat a pelletben mélyhűtött szaporítóanyaghoz képest. Maxwell (1980) viszont eltérő összetételű hígítót alkalmazott, azonban a mélyhűtés módszereként az általunk is használt pelletben történő mélyhűtést alkalmazta. A termékenyítőanyag minőségének meghatározását termékenyítési kísérletekkel ellenőrizte. A termékenyítési eredmények közül a 60% - os eredmény már megfelelőnek tekinthető.

*11. táblázat: Kossperma hígítás módszerei és hozzá tartozó termékenyítési eredmények*

Forrás	Hígító	Mélyhűtés módja	Termékenyítő képesség	
			tavasszal vett sperma	ősszel vett sperma
Colas and Brice (1976)	laktóz-tojássárgája + INRA-glicerol	műszalma	41% (termékenyítés tavasszal)	57% (termékenyítés tavasszal)
			51% (termékenyítés ősszel)	
			60% (termékenyítés ősszel)	
Maxwell (1980)	Tris-glucose-tojássárgája	pellet	41,8% (termékenyítés ősszel)	37,5% (termékenyítés tavasszal)
átlag			48%	47%

Különböző összetételű hígítók és mélyhűtési módszerek alkalmazásával az ősszel, illetve tavasszal mélyhűtött szaporítóanyag minták termékenyítésre való alkalmasságának vizsgálata termékenyült anyajuhok %-os aránya alapján.

**2.5.3.2. A spermaplazma fehérjék megakadályozzák a kossperma hidegsokk hatására bekövetkező membránkárosodását**

Pérez és mtsai, 2001 a spermaplazma funkció hatását széles körben vizsgálták a kapott eredményeik azonban mégis ellentmondásosak. Kimutatták, hogy hideg hatására a spermaplazma egyes fehérjéi abszorbeálódnak a spermiumsejtek felületén és ez az abszorpció képes visszafordítani a hidegsokk által okozott membránváltozásokat. Pérez és mtsai (2001) tanulmányukban azt értékelik, hogy a hidegsokk hatás előtt az ejakulátumhoz, vagy hígított spermához adott plazmafehérje

koncentrátum képes e megakadályozni a spermiumsejtek károsodását és fenntartani azok életképességét.

A spermaplazmától elválasztott kospermiumokról a dextrán/swim-up eljárással történő vizsgálat során bebizonyosodott, hogy a hideg-sokk kezelés 72,2+/-3,4%-ról 24,6+/-2,1-ra csökkenti a spermiumok életképességét.

A hidegsokk kezelés előtt történt spermaplazma proteinek (>3 kDa) hozzáadása a hígított spermához szinte azonnal érzékelhető jótékony hatást eredményeznek minden minta esetében.

Ez a hatás koncentrációfüggő, mivel az ép-membránfehérjék százalékos aránya jelentősen megnőtt és az inkubációs közeg fehérje koncentrációja is jelentős mértékben emelkedett.

A megfelelően magas fehérje koncentráció 1 óra 20°C-on történő inkubálás során megvédte a sejtmembránokat, míg a szükségesnél alacsonyabb koncentráció esetén a védelem kis mértékben csökkent.

A linolsav jótékony hatással volt a spermiumok életképességének megőrzésére, ha a mintákhoz 25, 37, vagy 75 pM linol-olajsavat adunk. Pozitív kölcsönhatás jött létre a zsírsavak és a spermaplazmafehérjék között. Így megfelelő koncentrációban plazmafehérje hozzáadása mellett a kezelés kiegészült 25pM olajsav hozzáadásával. Ennek eredményeképpen a kutatók a 25%-os élősejtszámú kontrol minta érték mellett 50,7%-os élősejtszámot mérhettek.

Hasonlóképpen a sperma plazmafehérjékhez a tokoferol-foszfát formájában adott E-vitamin javította a spermiumsejtek hidegsokk kezelés utáni túlélési arányát. Eredményeképpen a kontroll minta hidegsokk kezelése után kapott 26%-os élősejtszám érték helyett a hidegsokk kezelés előtt 1,6 mM E-vitamin- foszfát és a megfelelő koncentrációban spermaplazmafehérje hozzáadása mellett a kezelést követően is előfordultak 57%-os élősejtszám eredmények.

A vizsgálatok azt mutatják, hogy hidegsokk hatására csökkent funkciójú spermiumokból felszabaduló plazmafehérje hozzáadásával megelőzhetőek lennének a hidegsokk által elszenvedett káros hatások, amely egyben magasabb élősejtszám (%) értékeket eredményez.

A linolsav felvételét az E-vitamin, vagy plazmafehérjék hozzáadása növelné a hidegsokknak kitett spermiumok életképességét a szaporítóanyag mintákban. (Pérez és mtsai, 2001)

### **2.5.3.3 Motilitás javítása és dekapacitáció a mélyhűtött kossperma visszamelegítését követően**

Bernardini és mtsai. (2011) szerint a konzervált kosspermahoz adott spermaplazma egyes fehérjéi a spermiumsejtek plazmamembránjához kötődve kijavítják a mélyhűtés során elszenvedett membránsérüléseket.

A spermaplazma javítja a mélyhűtés után visszaolvasztott hígított sperma minőségét. Bernardini és mtsai. (2011) vizsgálatának célja az volt, hogy megállapításra kerüljön a különböző juhajták kosaitól

származó spermaplazma fehérjei képesek megkötődni más juhajták kosaitól származó mélyhűtés után visszaolvasztott spermiumsejtjeinek plazmamembrán felületén, javítva ezzel a mélyhűtés során bekövetkezett károsodást.

A különböző fajtájú kosok spermaplazmája javította ugyan a progresszív mozgékonyt a mélyhűtött-visszaolvasztott sperma esetében azonban nem javította a teljes motilitást, ezért a hatásért felelős fehérjék azonosítására egy új módszert fejlesztettek ki. A módszer alapja, hogy a spermaplazma membrán fehérjék kivonására közvetlenül a spermium membránból történjék. Ezek a fehérjék ugyanis specifikusan kötődnek a spermaplazma felszínén különösen az akroszómális régióban található meg nagy mennyiségben.

A laktotranszferint, az E1-el jelzett mellékhere szekréción fehérjét, a szinaptoszomális asszociált proteint 29 és az RSVP-20-as fehérjét (ram seminal vesicle protein) tömegspektrometria segítségével azonosították ebben a frakcióban. A spermaplazmában található fehérjék, valamint megfelelő minőségű és mennyiségű szénhidrát (jelen esetben fruktóz) hozzáadása csökkenti a spermiumsejtek ultrastrukturális károsodását, valamint fokozza a kossperma mozgékonyt (motilitását) a mélyhűtést követő felolvasztás után. (Bernardini és mtsai., 2011)

Mann és mtsai. (1978), valamint Muino-Blanco és mtsai. (2008) szerint az emlős spermiumok plazmája a hím nemi szervek

mirigyeiből származó szekrétumok összessége, fontos szerepet tölt be a spermiumok érése és működése során.

Mint az közismert az előkészítési és mélyhűtési, valamint a visszaolvasztási procedúra, strukturálisan és funkcionálisan egyaránt károsítja a spermiumsejteket. A spermiumsejtek termékenyítőképességének előfeltétele a kapacitációs folyamaton való átesés, amelyet a mélyhűtés nagymértékben elősegít. (Ashworth, 1994; Maxwell és mtsai., 1997; Bailey és mtsai., 2000)

Azonban amikor a mélyhűtésre kerülő hígított spermához spermaplazmát adunk az növeli a spermiumsejtek ellenálló képességét a mélyhűtés káros hatásaival szemben. (Evans és mtsai., 2000, El-Hajj Ghaoui, 2007)

A hozzáadott spermaplazma javítja a mélyhűtés után felolvasztott kossperma motilitását, életképességét, akroszóma integritását és a mitokondrium működését. (Ollero és mtsai., 1997; Maxwell és mtsai., 2007; Rebolledo és mtsai., 2007) A fentiekben említett kedvező hatásokat az alábbi szerzők is leírták Barrios és mtsai.(2000), Dominquez és mtsai. (2008), Marti és mtsai. (2008), Leahy és mtsai. (2009). Különösen az ondóhólyagban termelt RSVP 14 és RSVP 20 (ram seminal vesicle protein) fehérjékre jellemző a mélyhűtést követő javító hatás (Barrios és mtsai., 2005; Barrios és mtsai., 2000). A Barrios és mtsai. által 2000-ben és 2005-ben végzett kísérletek során ezen fehérjék oszlopkromatográfiával kerültek kinyerésre a



spermaplazmából. Ezen fehérjéket Rasa Aragonesa kosok spermium membránjából és akroszómájából nyerték ki.

Azt már korábban Kelet-fríz fajtájú kosoknál végzett vizsgálatok során is megállapították, hogy ezen két fehérje mellett a spermaplazmában történő inkubáció során további 5 hasonló hatással rendelkező fehérjét találtak az inkubációs vizsgálatok során. (Dominquez, 2008) Ezen fehérjék védő hatása a membrán állapotának stabilizációjában, illetve a dekapacitáció megakadályozásában nyilvánul meg (Muino-Blanco és mtsai., 2008).

Továbbá, mivel az RSVP14 és RSPV20 antioxidáns hatása (Marti, 2007) és a kriokapacitációs időszakban indukált szabadgyökkeletkezésre is jótékony hatással lehetnek ezen fehérjéknek a korai oxidatív stressz- és kapacitáció elleni védelemben is jelentős szerepük van.

A spermaplazmával végzett kísérletek nagymértékben hozzájárulnak a kapacitációs folyamatok során végbemenő molekuláris szinten zajló mechanizmusok megértéséhez. Ezen túlmenően a spermaplazma azon molekuláinak azonosítása is megtörtént, amellyel a membránkárosodás megelőzése és javítása is lehetséges. A kutatás eredményeként lehetővé válik a sperma felolvasztás utáni osztályozása is (Leahy, 2009).

Bernardini és mtsai. által 2011-ben végzett vizsgálat célja annak bizonyítása volt, hogy a spermaplazma képes a plazmamembrán

proteinjeit megkötni a konzervált kosspermában a mélyhűtés során bekövetkező minőségromlásának elkerülése érdekében.

#### **2.5.3.4. A spermaplazma összetételének szezonális változásai és annak hatása a mélyhűtés után felolvasztott kosspermára**

Domínguez és munkatársai (2008) szerint a mélyhűtés előtt hozzáadott spermaplazmával kezelt mélyhűtött kossperma hidegsokk hatására elszenvedett károsodásai a felolvasztás után szezontól függően visszatérhetnek. A szerzők vizsgálataik során a fríz kosoktól származó spermát értékelték különböző időszakonként minden évszakban inkubáltak  $-18^{\circ}\text{C}$  és  $196^{\circ}\text{C}$ -on tárolt kossperma mintákat. Mindkét hőmérsékleten tárolt minták esetében ősszel, télen vett ejakulátumból előállított spermaplazmával végzett kezelés esetén a kezelt mintáknak nem volt megfelelő a motilitása. A vizsgálatok során kizárólag a tavaszi, illetve nyári ejakulátumból előállított spermaplazma állt rendelkezésre. Ennek a kezelésnek azonban nem volt semmilyen hatása sem az életképességre, sem a membrán, vagy az akroszóma állapotára. (Domínguez és mtsai, 2008)

A Pharmagene-Farm Kft.-nél 2008-2009 között végzett vizsgálataink során szerzett tapasztalatok alapján a tavaszi ejakulátumból nyert spermaplazmának egyaránt javító hatása volt a mélyhűtés után visszamelegített spermiumsejtek motilitására, valamint a dekapacitációs folyamatokra.

Domínguez és mtsai. (2008) által végzett vizsgálatait során a spermiumok felületéhez 13 féle fehérje kötődött. A spermaplazmában található proteinek kötődése az évszak által meghatározott, a konzerválás hőmérsékletétől viszont egyáltalán nem függ.

Ha a spermiumok inkubálása ősszel vett spermaplazmával történik az 5 féle protein koncentrációját emeli meg, ezek közül 2 volt azonosítható (specifikus antitestekkel) az RSVP14 és az RSVP20. Következtetésként levonható, hogy az őszi és téli időszakban vett ejakulátumokból nyert spermaplazma növeli a mélyhűtött-visszaolvasztott kossperma minták motilitását és a spermaplazma – 18°C, vagy -196°C-on történő tárolása során nem változtatja meg azok protein összetételét. Azok a spermaplazma proteinek, amelyek a spermiumok felszínéhez kötődnek elképzelhető, hogy felelősek a spermiumsejtek membránjának stabilizációjáért azonban ennek bizonyításához még további vizsgálatokat kell elvégezni. (Domínguez és mtsai, 2008)

#### **2.5.3.5. Szezonális változás a spermaplazma visszaolvasztott kossperma membránjára gyakorolt védő hatásában**

Leahy és mtsai. (2010) szezonális változást figyeltek meg a spermaplazma fehérjék sperma membránra gyakorolt védő hatásának tekintetében. Az ejakulátumhoz, vagy hígított spermához hozzáadott spermaplazma jelentősen eltérő hatással lehet a különböző mintákra. Jelenléte lehet serkentő, vagy akár gátló tényező is. Jelen vizsgálat célja az volt, hogy felmérje a spermaplazma a mélyhűtés után

visszaolvasztott spermiumsejtekre gyakorolt hatását. A spermaplazma vizsgált változói voltak a szezonban gyűjtés, frakcionálás és a spermiumsejtekhez való hozzáadás ideje és mennyisége. A hígított szaporítóanyaghoz a mélyhűtés előtt seminális plazmafehérjét adtak. A felolvasztást követően, valamint a szaporítóanyag 37°C-on történő inkubálása során a motilitást és az életképességet értékelték.

Az első kísérletben kontrollként hígított sperma trisz alapú hígítóval hígított sperma, a spermaplazmával kezelt minták előállításához egész évben a déli féltekén gyűjtött sperma, valamint az alábbi időszakokban összevontan, vagy frakcionálisan szemínális plazmafehérje előállításához, vagy nyers spermaplazma előállításához gyűjtött spermaplazmát használtak. Gyűjtés időszakai: január-március, április-június, július, augusztus, október-december. A spermiumok mozgékonyására nem volt hatással a szezon, vagy a spermaplazma típusa (nyers, vagy spermaplazmafehérje koncentrátum hozzáadása történt). A januártól szeptemberig összegyűjtött nyers spermaplazma hozzáadás esetén megfigyelhető volt, hogy a kontrol mintához képest javult a spermiumok életképessége. A spermaplazma fehérjék hozzáadása esetén pedig időszaktól függetlenül a spermiumok életképességének fokozódása volt jellemző, nyers spermaplazma hozzáadása esetén pedig a januártól júliusig begyűjtött szaporítóanyagoknál volt tapasztalható pozitív változás az életképesség javítása terén.

A második kísérlet során természetesen kontrol mintát is alkalmaztak, amely nem került spermaplazmafehérjékkel történő kiegészítésre. A

plazmafehérjével kiegészített minták esetében javult a spermiumsejtek motilitása, az életképesség, valamint az ép akroszómájú spermiumsejtek aránya. A két módszer közül a közvetlenül az ejakulátumba kerülő spermaplazma fehérjék adnak jobb eredményt az életképesség és az ép akroszómájú spermiumok arányának növelése tekintetében.

Ezek az eredmények azt mutatják, hogy javasolható a kos ejakulátumának mélyhűtés előtti nyers spermaplazmával, vagy spermaplazma fehérjéssel végzett adalékolása. A nyers spermaplazma és a spermaplazma fehérje megvédi a spermiumsejteket a mélyhűtés-visszamelegítés során bekövetkező káros hatásoktól. A legnagyobb hatással a párzási időszakban (őszi főszezonban) összegyűjtött spermaplazmából készült szűrés segítségével kinyert spermaplazmaprotein (>10kDa SPP) bír, a leghatékonyabb akkor, ha közvetlenül a mélyhűtésre szánt ejakulátumhoz adják. (Leahy, 2010)

#### **2.5.3.6. A hidegsokk és a hűtési sebesség mértékének hatása a kosspermiumok kalcium felvételére**

Simson és White (1986) szerint a hidegsokk és hűtési sebesség mértéke befolyásolja a kos spermiumok kalcium felvételét. Gyors hűtés által előidézett hidegsokk hatására visszafordíthatatlanul csökkent a kosspermiumok motilitása és respirációja, illetve megnövekedett a  $\text{Ca}^{2+}$  felvétele.

A hűtés hőmérsékletének 15°C-ról 0°C-ra való csökkentésével a sejtek kalciumszintjének jelentős növekedése volt tapasztalható. Ezt követően a spermiumsejteket 10°C-ra történő lassú lehűlés követte, amely során csökkent a sperma kalcium tartalma. A sperma  $\text{Ca}^{2+}$  felvétele - 79°C-on nem volt olyan nagy, mint 0°C-on.

A spermiumok 50°C-on történő enyhe hőkezelésének nem volt kalciumfelvételre gyakorolt szignifikáns hatása, azonban a későbbi hidegsokk növelte a sejtek kalcium felvételét.

A sperma alacsony koncentrációban formaldehiddel történő kezelése során jelentősen csökkent a hidegsokk hatására bekövetkező kalciumfelvétel fokozódása. Kiegészítő módszerekkel a spermiumok mozgékonyága azonnal csökkenthető, a respiráció és a kalcium felvétel ellenőrzése mellett hidegen tárolt sperma esetén is nullára csökkenthető. (Simson és White, 1986)

Az optimális kalcium koncentráció fenntartása az érett spermiumokban a membrán ion csatornáinak és a plazmamembrán valamint a mitokondrium kölcsönhatásától függ. (Simson és mtsai, 1986)

Bradley és mtsai. (1979) szerint a mitokondriumok szerepe, hogy felhalmozzák a kalcium ionokat, mivel a plazmamembrán ioncsatornáin keresztül keresztül a  $\text{Ca}^{2+}$  a  $\text{Mg}^{2+}$  és az ATP kifelé áramlik (Bradley és Forester, 1980; Breitbart és Rubinstein, 1983; Breitbart és mtsai, 1983, 1984)

Az emlős spermiumok  $\text{Ca}^{2+}$  felvételével kapcsolatban kimutatták, hogy az ún. akroszóma-reakcióban vesz részt. (Babock és mtsai., 1976; Peterson és mtsai., 1979 ; Green, 1978 ; Peterson és mtsai., 1978; Jamil és White, 1981; Shams-Borman és Harrison, 1981) A  $\text{Ca}^{2+}$  szükséges az adenil-cikláz aktiválásához, illetve a spermiumsejtek motilitásának indukálásához. (Morton és mtsai., 1973; Hyne és Garbers, 1979 a,b)

Ha túl nagy a külső közeg koncentrációja az számos faj spermiumsejtjeinek esetében csökkenti a spermiumsejtek motilitását, feltehetőleg az intracelluláris kalcium szint túl magas szintre történő emelkedése miatt. (Rosada és mtsai, 1970; Quinn és mtsai, 1970; Brokaw és mtsai, 1974; McGrady és mtsai, 1974; Davis és mtsai, 1978).

Ha a kos-, vagy bikaspermát gyors hűtési sebességgel  $0^{\circ}\text{C}$ -ra hűtjük visszafordíthatatlanul csökkentjük annak motilitását és metabolikus aktivitását, ezen felül még a plazma membrán áteresztőképessége is megváltozik (Blackshaw, 1954a; Mann, 1955; Blackshaw és Salisbury, 1957; Wales és White, 1959; Quinn és White, 1966; Quinn és mtsai., 1969; Karagiannidis, 1976; Glover és Watson, 1985)

Atomadszorpciós spektrometriás elemzések arra utalnak, hogy ezen a hidegsokk változásokat a spermiumok kalciumtartalmának növekedése kíséri. (Quinn és White, 1966; Karagiannidis, 1976)

Simson és White, (1986) jelen vizsgálatban a hidegsokk és a kalcium iontoxikáció mérésével foglalkoztak. A vizsgálatokat radioaktív

kalciummal végezték, úgy hogy a spermiumok lehűlése közben felvételeket készítettek. A témában összehasonlító tanulmányok is készültek a kos spermát enyhe hőhatásnak és olyan detergens anyagok hatásának tették ki, amely megzavarja a membránok működését.

Dott és Foster, 1975 a kosspermát kis koncentrációjú formaldehid kezelésnek tették ki. Vizsgálataik során kimutatták, hogy a hidegsokk csökkent a bika sperma érzékenységét feltehetően stabilizálja a plazmamembrán állapotát. (Karagiannis, 1976)

Simson és White, 1986 vizsgálata során a spermiumsejtek  $\text{Ca}^{2+}$  felvételét mérték.

## **2.6. Kossperma tárolása**

### **2.6.1. A mesterséges termékenyítés és sperma tartósítás történeti áttekintése**

A mesterséges termékenyítés vizsgálatok a 20. század elején indultak. Ivanov 1907-ben, illetve 1912-ben publikálta a mesterséges termékenyítési kísérletek eredményeit. Az első világháború után a további intenzív vizsgálatokra Milovanov vezetése alatt került sor. Az egykori Szovjetunióban az 1930-as évek elején egy juhtenyésztési program keretében már nagy mennyiségben használtak frissen hígított spermát mesterséges termékenyítésre. Ehhez azonban szükségessé vált a sperma szállítása a gyűjtés helyszíne és a termékenyítés helyszíne között. Így szükségessé vált, hogy a huzamosabb ideig tartó tárolás is lehetővé váljon olyan módszerekkel, amelyek csökkentik, vagy



leállítják az anyagcserét és ezáltal hosszabbítják meg a szaporítóanyag termékenyítőképességét.

Maxwell és Salamon, 1993 a kossperma frissen hígított folyékony és fagyasztva tárolása során alkalmazott módszerekről szerzett széles körű tapasztalatokat felölelő értekezést tettek közzé.

Az első feljegyzések szerint Breinstein és Petropavlovsky 1937-ben sikeresen alkalmaztak 1M-os 9,2%-os glicerines oldatot nyúl, tengerimalac, kos, bika, vaddisznó, csődör és kacsá spermiumok tárolására

Szmirnov 1949-50-ben és 1947-ben illetve 1950-ben vitrifikáció nélkül glicerinnel kis kisserelésben 0,05-0,1 ml mélyhűtött kos, illetve bika spermával végzett termékenyítési kísérleteket. 1949-ben 19 anyajuh háromszori termékenyítésben 15 percen át fagyasztott spermát használtak fel. A termékenyítések eredményeként 7 anyajuhtól 11 bárány született. Az 1951-ben végzett mesterséges termékenyítések eredményeképpen a kísérlet során termékenyített 11 tehéntől 5 borjú született. Bebizonyosodott tehát, hogy a vizsgálatok során használt hígító krioprotektív tulajdonságát a glicerin okozta.

Az 1950-es években jelentős kísérlet zajlott a fagyasztva tárolásra vonatkozóan. Kezdetben a bikasperma mélyhűtéséhez használt hígítóval történt kossperma mélyhűtés eredményei, nem voltak megfelelőek. Az ezzel az anyaggal végzett termékenyítések csupán 5%-os termékenyítési eredményeket mutattak. 5%-os termékenyítési eredményeket mutatott. Blackshaw és Emens, 1953, Dauizer, 1956

kutatási eredményei nyilvánvalóvá tették, hogy a bika spermára alkalmazott módszer nem működik a kossperma esetében. Az évek során rengeteg kutatás zajlott, ezáltal rengeteg információ gyűlt össze a kossperma mélyhűtésével, tárolásával kapcsolatban, mind a különböző hígítók, krioprotektív anyagok, az előkészítés, feldolgozás, mélyhűtés területén, valamint a mélyhűtés során keletkezett károk és a kos spermiumok termékenyítő képességére vonatkozóan.

## **2.6.2. Hígítás**

A kossperma tartósítására használt hígító esetében szükséges a megfelelő pH, pufferkapacitás, ozmotikus nyomás és spermiumok védelme a legfontosabb követelmények, melyeknek egy hígítónak mindenképpen meg kell felelnie.

### **2.6.2.1. Laktóz alapú hígítók**

A laktóz, mint a hígítók fő szénhidrát összetevője, a bika sperma esetében jól bevált, ezért alkalmazzák a kosspermánál. A kezdeti in vitro vizsgálatoknál, ahol laktóz alapú hígítószeret alkalmaztak ellentmondásos eredmények jöttek ki és a termékenyítési tesztek sem hoztak meggyőző eredményt. Az ezt követő vizsgálatok ellési eredményei alacsonyak 29%-os, illetve 40-50% közepes eredményűek voltak a laktózt és tojássárgáját tartalmazó hígítók esetében. A termékenyítőanyag hígításához laktóz és tojássárgája alapú analitikai tisztaságú glicerinnel dúsított és glicerin nélküli hígítókat használtak.

Diszacharidok közül laktózt és szacharózt találták hatékonynak, amelyek megfelelő mértékben csökkentik a kristályosodási hőmérsékletet a mélyhűtés alatt, mint a monoszacharidok. Ennek hatékonyságát növelte az EDTA-Na és dietil-amin hozzáadása. (Platov, 1988)

Platov (1977) egy komplex poliszacharid, a gumiarábikum és a laktóz alapú hígítók hatását vizsgálta. A gumiarábikum egy nagy molekulatömegű komplex poliszacharid. A gumiarábikum használata azért is előnyös a hígítókból, mert jól tolerálják a spermiumok és extracelluláris krioprotektív tulajdonsággal is rendelkeznek.

A Platov (1977) által végzett vizsgálatok a spermát 2 lépésben hígítják a begyűjtés után először nem glicerinezett laktózt és tojássárgáját tartalmazó hígítót, majd összekeverés után a laktóz-gumiarábikum-tojássárgája-glicerinnel, vagy laktóz-tojássárgája-EDTA-Na-dietil-amin-gumiarábikum-glicerinnel összetételű hígítót a hígítandó szaporító anyaghoz.

A további vizsgálatokban a gyakran alkalmazták a Platov és munkatársai (1988) által kidolgozott az orosz Lesnie Poljaniról elnevezett Állattudományi Kutatóintézet által kossperma feldolgozásra és fagyasztásra ajánlott rendszert. E rendszer szerint a spermát 2 lépésben kell hígítani első 1,5-2-szeres hígítás glicerinnelmentes hígítóval, a második a 2-szeres hígítást alkalmaztak glicerinnel közegben. Az 1. kísérlet során használt hígító mindkét lépésben az alábbi anyagokat tartalmazta: 9%-dextrán, 5% EDTA-

Na, 0,105 – 0,135 % trisz- tojássárgája, 20% antibiotikum, 14% glicerin. A második kísérlet során használt 1-es hígító 12% laktózt, 20% tojássárgáját tartalmazott, a második lépésben hozzáadott hígító egy glicerintartalmú hígító, amelynek összetétele: 17% laktóz, 14,5% gumiarábikum, 6% trisz, 0,6% citrát, 0,27% tojássárgája, 20% antibiotikum. Az equilibráltatási idő 1 óra. Majd 0,2 ml kiszerezésben granulálták szárazjéggel, vagy polimer lemezzel. A termékenységi vizsgálatok összehasonlításakor a hígító összetételének megváltoztatása hatására a Platov vizsgálatai során kapott ellési % eredmények 26%-ról 60%-ra változtak.(Platov, 1988)

Zeltobjuk és mtsai, (1981) megállapították, hogy 5-6% poliglukin, illetve a nagy molekulatömegű 10% glükóz polimereket tartalmazó tojássárgája alapú hígító nem ad jobb eredményt, mint a Platov féle hígító. Azonban a fagyasztott spermával való termékenyítés esetében a laktóz-dextrán alapú oldószerek használata hozott elfogadható eredményt.

#### **2.6.2.2. Glicerin, mint krioprotektív anyag**

A glicerin a hígítókból leggyakrabban használt védőanyag, amelyet kossperma mélyhűtésére használnak. A kutatók megállapították, hogy fagyasztott sperma hagyományos lassú mélyhűtési módszerek használata mellett az optimális glicerin koncentráció 6-8%-os tartományban van. A lefagyasztott spermiumsejtek pelletált formában 3-4%-os glicerin koncentráció mellett élnek túl legnagyobb eséllyel a mélyhűtést.

Graham és mtsai szerint (1978) a glicerín 6%-nál magasabb koncentrációban káros a felolvasztás utáni túlélés szempontjából. Az ezen eljárás során alkalmazott glicerín koncentráció attól függ, hogy a mélyhűtésre szánt szaporító anyag bikasperma, vagy kossperma, ugyanis a kos spermiumsejtjeibe a glicerín könnyebben behatol.

Fahy, 1986 szerint a hozzáadott glicerín mennyisége és a hozzáadás módja függ a hűtés fagyasztás sebességétől, a hígító összetételétől, a hozzáadott glicerín mennyiségétől és a hozzáadás módjától. A vizsgálat együttes hatását a glicerín koncentráció (0-8%) és a hűtés sebessége határozzák meg a pelletálás során. Ezt követően a száraz jégen, folyékony nitrogénben történő hűtés.

Visser és Salamon (1974c) 0-16%-os krioprotektív anyag koncentráció mellett a 1-100°C/min hűtési sebességgel történő mélyhűtést alkalmazták.

Fisher és Fairful, 1984-ben kimutatták, hogy a magasabb hűtési sebesség és az optimális glicerín koncentráció csökkentése mutat a legjobb a felolvasztás után élősejtszámot. Vizsgálataik során 4-6% glicerín koncentrációt és 10-100°C/min hűtési sebességet alkalmaztak.

Voltak azonban olyan kísérletek is, ahol a kutatók, mint például Varnvskij, Varnavszkaja, (1976), Milovanov és mtsai (1985) viszonylag kis 2,0-3,5%-os glicerín koncentrációval dolgoztak. A glicerintartalmú hígító az előkészítés során egy-, illetve kétlépéses módszerrel adható az ejakulátumhoz a mélyhűtésre történő előkészítés során. Kezdetben a glicerintartalmú hígítót 29°C-on, majd 5°C-on

adták az ejakulátumhoz a mélyhűtésre történő előkészítés során. A vizsgálatok során egyértelműen az 5°C-on történő hozzáadást találták legalkalmasabbnak.

Francia kutatók Colas és Brice (1975) megállapították, hogy a laktóz és tojássárgája tartalmú hígítóban az INRA glicerol (analitikai tisztaságú glicerol) használata őrzi meg legjobban az ejakulátum termékenyítő képességét. A 4 % glicerin hozzáadásának, pedig 4 és nem 30°C-on kell történnie. Vizsgálataik során azt találták, hogy a kétlépéses hígítás során hozzáadott glicerines rész egy lépésben történő hozzáadása legalább ugyanolyan, vagy még jobb eredményeket adott, mint a glicerintartalmú hígító több lépésben történő hozzáadása esetén. (Colas és Brice, 1975)

Salamon (1968), illetve Salamon és Lightfoot (1969) kutatási eredményeik alapján arról számoltak be, hogy az egy lépésben történő hígítás során kapott eredmények is voltak olyan jók, mint a kétlépéses hígítás során kapott eredmények, de a korábbi hígításos módszer hatékonysága függ a hígítóban használt szénhidrát komponenstől.

Lopatko (1976), valamint Abdelhakeam és mtsai. (1991) vizsgálataik során, 26%, 52% ellési % eredményeket kaptak a glicerin nélküli hígítóval történő mélyhűtésre történő előkészítéssel, 3 órával a spermavétel után történő 5°C-on 25-30%-os tojássárgáját, puffert, illetve 10% maltózt tartalmazó hígítóval végzett hígítást utáni mélyhűtésből származó szaporítóanyaggal történő termékenyítés eredményeként. A glicerint mellett számos egyéb hígító alapanyagául

szolgáló szert is megvizsgáltak. Krioprotektív anyagként például dimetil-etilén-glikol (DMSO), albumin, kis molekulatömegű poliolkok, polimer vegyületek, felületaktív anyagok, a cukrok magas koncentrációja, különböző típusú kompatibilis oldott anyagok, mint például a prolin, glicin-betain, taurin és fagyálló fehérjék. Azonban egyik vizsgált szer sem bizonyult jobbnak, mint a glicerin. (Salamon és Maxwell, 1995)

### **2.6.2.3. Tojássárgája, mint összetevő**

A tojássárgája gyakori alkotórésze a sperma hígítóknak, mivel védi a spermiumokat a mélyhűtés és visszamelegítés hatására bekövetkező sokk ellen védi a sejtmembránokat. A korai kutatások során 30-50%-ot használtak, a későbbi vizsgálatok legtöbbször azonban ennél alacsonyabb koncentrációt alkalmaztak a hígítóknak. Az ampullás fagyasztás során 3-6%-nyi mennyiséget alkalmaztak, a pelletben történő fagyasztásra azonban 15%-os mennyiség volt az optimális bár a hatás függ a hígító összetételétől is. (Salamon és Lightfoot, 1969)

Abdelhakeam és mtsai (1991) szerint a kossperma glicerin nélküli fagyasztása esetén a tojássárgája 25-30%-os koncentrációra történő növelése válik szükségessé a plazma membrán védelme.

### **2.6.3. A mélyhűtés és felolvasztás**

A mélyhűtés előtti hígításra kezdetben a kutatók 11-26-szoros, a későbbiekben viszont 2-6-szoros hígítási arányokat alkalmaztak.

Mivel a hígítót nem igazították a különböző mértékű hígítás hatását nem lehetett meghatározni. Manapság 2-5-szörös hígítási arányokat alkalmaznak a mélyhűtés során és a hígító készítmény korrigált mértékét Salamon (1976), Evans és Maxwell (1987) határozták meg. A hígítás után a sperma hőmérsékletét 0°C körüli hőmérsékletre hűtötték ezzel csökkentve a metabolizmust. A mélyhűtés előtt a cél egy kiegyensúlyozott intra- és extracelluláris koncentráció. A kétlépéses partner bizonyos hígítási partnerhez. Optimális esetben a glicerinnel való hozzáadása 2-5 °C-on történik. Azonban, ha a hígítás egy lépésben történik, akkor 30°C-on kell végezni. Mindkét módszernél az egyensúlybe hozás időtartama 1-3 óra között változik.

Raffinóztartalmú hígító esetében 1-2,5 egyensúlybe hozási idő az optimális. Salamon (1976), Evans és Maxwell (1987) egy lépésben és glicerinnel való tápközegben történő hígítást és 1,5-2 óra egyensúlybe hozási időt javasol.

A hűtés mértéke jelentősen befolyásolja a hígított sperma fagyasztás utáni túlélését. Az ampullákban mélyhűtött sperma hűtése lassú hagyományos módszerrel történik. Ezt a módszert ritkán használják PVC minitube és pellet formában történő mélyhűtésre. (Salamon, 2000)

Colas és mtsai (1975) a műszalmában történő mélyhűtést folyékony nitrogén gőzben végezték. A hűtés sebességét a nitrogén gőztől való távolsággal szabályozták. Ha a műszalmákat a nitrogéngőz felett



felfüggesztve előhűtést végeztek, akkor a nitrogéngőz csökkentette a túlélő spermiumok arányát. (Colas, 1975)

Visser és Salamon (1974), Fisher és Fairfull (1984) vizsgálataik eredményeképpen arra jutottak, hogy a hűtési sebesség összefüggésében van a glicerín koncentrációval. 10-100°C/min hűtési sebesség esetén a túlélés aránya csökkent.

Rey, 1957 megfigyelései szerint, ha a folyékony spermát közvetlen folyékony nitrogénbe helyezték, az azt eredményezte, hogy az összes spermiumsejt elpusztult. Ennek oka, hogy a folyékony nitrogénbe merítés esetén nagyon gyors a mélyhűtés sebessége.

Azonban amikor szárazjég felületére hígított sperma cseppeket pipettáztak, vagy fiolába töltött hígított spermát 5-7s-re folyékony nitrogénbe merítenek ezután néhány percig folyékony nitrogén gőzben tartották, végül folyékony nitrogénben került mélyhűtésre. A kutatók azt tapasztalták, hogy így a felolvasztás után a sperma motilitása és termékenyítési eredményei megfelelőek voltak. (Visser és Salamon, 1974)

### **2.6.3.1. A mélyhűtött sperma felolvasztása**

A mélyhűtés-visszaolvasztási eljárás és inkubálás fázisa egyaránt fontosak a túlélés szempontjából. A spermiumoknak, amelyek túléltek a -196°C-ot még mindig meg kell küzdenie a kiolvasztás során a számára kedvezőtlen hőmérséklettel.

A hűtési sebesség és felolvasztás egyaránt negatív hatást fejtenek ki a spermiumok túlélésére (Mazur, 1985). A hatás attól függ, hogy a hűtési sebesség már elég, az intracelluláris fagyasztáshoz, vagy elég alacsony ahhoz, hogy a sejt kiszáradjon a mélyhűtés során. Az előbbi eset a gyors felolvasztás megakadályozása érdekében kötelező, ha jelen van az átkristályosodás a spermiumok belsejében. A spermiumok gyors ütemben történő felengedése esetén szükség van a egy krioprotektív anyagra, amely jelen esetben a glicerin.

A korai kutatók között nem volt egyetértés az optimális visszaolvasztási hőmérséklet tekintetében. Néhány kutató úgy látta, hogy az ampullákban történő mélyhűtés a bikáknál alkalmazott módszer alkalmazása a jobb megoldás. Ebben az esetben a visszaolvasztás 40-43°C-on történik. Más kutatók a felengedett ampullákat jeges -, 2-5°C-os, illetve 6-8°C-os vízben, vagy szobahőmérsékleten 18-20°C javasolják. A legtöbb kutatásról szóló publikációban a gyorsfagyasztott 37°C-os vízfürdőben felolvasztott kossperma eredményei szerepelnek. A mélyhűtött kosspermát 38-42°C-on engedik fel. Egyes kutatók ennél magasabb hőmérsékleten történő felolvasztást javasolnak. Véleményük szerint a 60-75 °C-on felolvasztott kossperma eredményei hasonlóak voltak a 38-42°C-on történő felolvasztás után kapott motilitási, akroszóma integritási és termékenyítési eredményekhez. A pelletben mélyhűtött sperma felolvasztása történhet akár nedves, vagy száraz kiolvasztással is. Előbbi esetben nem csupán a jelenlét, hanem a készítmény felolvasztását az oldat összetétele befolyásolta. A spermiumok

motilitása nagyban függ a hígító összetételétől. A szacharóz-citrát-tojássárgája összetételű hígító inozit-citrát, glükóz és fruktóz oldatok a legjobbak. Visszaolvasztási hőmérsékletként 37°C javasolható. (Salamon és Maxwell, 2000)

Salamon és Visser (1972) szerint nincs összefüggés a mélyhűtés előtti hígításhoz használt hígító összetétele és a száraz, vagy nedves visszaolvasztás között. A különböző kutatók által alkalmazott visszamelegítési hőmérséklet a nedves és száraz felolvasztás esetén egyaránt a 37°C és 75°C közötti hőmérséklet.

### **2.6.3.2. Spermiumsejtek károsodása a mélyhűtés utáni felolvasztást követően**

Mélyhűtés utáni visszamelegítést követően a spermiumsejtek 40-60%-a őrzi meg motilitását, ezen sejtek 20-30%-a, amely biológiai értelemben (funkcionálisan) is sértetlen marad. Ha a spermium motilis, de biológiai értelemben sérült, akkor kétségesse válik, hogy alkalmas-e a petesejt megtermékenyítésére.

Kérdéses, hogy a spermiumok motilitása és szerkezeti változásai milyen mértékben érintettek a termékenyítőképesség szempontjából és hogy a változások egyidejűleg, vagy a mélyhűtés-visszaolvasztás mely szakaszaiban történtek.

Strukturális kár keletkezhet a sejtplazmában (plazmamembránban), az akroszómában, vagy a mitokondriumban. A mélyhűtés során elszenvedett strukturális kár a kossperma esetében általában

súlyosabb, mint a bikaspermánál. Mind az alacsony, mind a magas hűtési sebességgel mélyhűtött kossperma jobban megőrizte motilitását és morfológiai integritását. A spermiumsejt plazmamembránja és akroszómája sokkal érzékenyebben, mint a sejtmag és a farkrész középdarabja. A külső membrán és az akroszóma sokkal sérülékenyebbek, mint a sejt belső membránrendszere. Megfigyelték, hogy a mitokondrium károsodott a mélyhűtés-felolvasztás során, azonban a farkrészben nem mutatkozott jelentős változás. (Salamon és Maxwell, 2000)

A mélyhűtés során elszenvedett strukturális károsodást biokémiai változások (károsodások) is kísérik. A változások során a glutamin, oxálcetsav, transzamiláz, valamint lipoprotein, aminosav veszteség következik be a sejtekben, csökken a foszfatáz aktivitás, illetve a koleszterin, amely növeli a nátrium és kálium tartalom csökkenését, inaktiválja a hialuronidáz és akrozin enzimeket, a sejt elveszíti prosztaglandin tartalmát, csökken az ATP és ADP szintézis, valamint az akroszóma proteolitikus aktivitása. (Salamon és Maxwell, 1995b)

A változások között említendő, hogy a mélyhűtés során a DNS denaturációja is előfordulhat, ami a kromatin szerkezetének változásában nyilvánul meg. Ezt a fajtaváltozást bika, vaddisznó, macska, ember, valamint kos spermiumok esetében is észlelték. (Maxwell, 1999)

A fentiekben említett mélyhűtés hatására bekövetkező strukturális, illetve biokémiai változások a spermiumok női nemi utakban

spermiumtranszport során való túlélési arány csökkenéséért, a funkcionális működési zavarokért, valamint termékenyítő képesség csökkenéséért felelősek. (Salamon és Maxwell, 2000)

### **2.6.3.3. Mélyhűtés és visszaolvasztás következtében bekövetkező motilitás csökkenés**

A spermiumok életképességét és termékenyítőképességét a női nemi utakban számos kutató vizsgálta. Az általuk kapott eredmények és megfigyelések széleskörű áttekintését, összegzését és értékelését Salamon és Maxwell (1995b) végezte el. Közös munkájuk eredményeképpen megállapították, hogy a mélyhűtés után felmelegített spermiumsejtek esetében csökkent az életképesség. Az anyajuhok genitális traktusába jutva ugyanis nincs megfelelő motilitásuk, amely cervikális termékenyítés esetén a termékenyítési eredmények jelentős csökkenéséhez vezet. Cervikális termékenyítés esetén ugyanis a mélyhűtés után visszaolvasztott spermiumok pusztulása nagyobb arányú, mint a friss spermiumok esetében. (Maxwell és Gillian, 1999)

Amikor azonban a mélyhűtés után felolvasztott spermiumokat közvetlenül a méhszarvakba, vagy a petevezetőbe helyezik, akkor akár 85-95%-os termékenyítési eredményeket is elérhetnek, ez azt mutatja, hogy a biológiailag ép spermiumok megőrzik termékenyítő képességüket a mélyhűtés-felolvasztás során. (Salamon és Maxwell, 2000)

## 2.7. Mesterséges termékenyítés

Halbert és mtsai (1990) leírták a külső méhszáj felépítését, négy típusba sorolva az előforduló formákat. Az általuk elvégzett csoportosítás alapján kacsacsőr, vitorla, rozetta és spirális felépítés különböztethető meg, amelyek közül vitorla és rozetta típus fordul elő leggyakrabban. Az említett szerzők az alábbi fajták egyedeit vizsgálták, kis számban cheviot, suffolk keresztezett, leichester, clun forest és hampshire keresztezett egyedeket tanulmányoztak.

Későbbi tanulmányokban Kershaw és mtsai (2005) a külső méhszáj alakulása szempontjából öt típust határoztak meg: rés, papilla, kacsacsőr, vitorla, rozetta. Idősebb anyajuhok esetében a rozetta típus, míg jerekékben a papilla volt a leggyakoribb.

Szabados és mtsai 2005, illetve Gergátz (2007) véleménye szerint a termékenyítő katéter penetrációjának mélysége és a fogamzási eredmények között pozitív korreláció figyelhető meg. Ennek következtében a nyakcsatorna és a külső méhszáj felépítésének tanulmányozása segítséget jelenthet a fogamzási eredmények javításában, bár a külső méhszáj alakja nem determinálja egyértelműen egy anyajuh mesterséges termékenyítésre való alkalmasságát. (Veksler-Hess és Cisale, 1992).

Szabados és mtsai. (2008) szerint eredményes inszeminálások után, az ellések száma és a méhszáj típus között, a kacsacsőr forma esetén negatív ( $r=0,883$ ) a rozetta típusban szoros pozitív ( $r=0,899$ ), míg a

vtorla ( $r=0,109$ ) és a spirális ( $r=0,374$ ) felépítés esetén laza, nem szignifikáns összefüggések voltak. A katéter penetrációja és a méhszáj típus közötti összefüggés vizsgálat szerint, a többször ellett anyákban ( $r=0,608$ ,  $P<0,01$ ) a rozetta és vitorla típus esetén nagyobb mértékű penetrációt lehet elérni, mint a kacsacsőr és a spirális felépítés esetében. A kacsacsőr és spirális, illetve a rozetta és vitorlaformák között nem mutatható ki különbség. Az egyszer ellett egyedekben elérhető penetrációk szintén nem különböznek a külső méhszáj felépítése alapján. Mivel a spermadeponáció helye és a vemhesülési eredmények között pozitív korreláció van, a kapott eredmények jelezhetik az egyes egyedek termékenyítésének várható sikerességét (a penetráció mértékét) a vizsgálatokban alkalmazott katéterrel. Le kell szögezni azonban, hogy egy anyajuh mesterséges termékenyítésére való alkalmasságát a külső méhszáj felépítése önmagában nem határozza meg. (Szabados, 2008)

## **2.8. Kossperma minőség vizsgálatának eredményei a nemzetközi szakirodalomban**

### **2.8.1. Frissen vett és inkubált termékenyítő anyaggal végzett termékenyítések eredményei**

Mivel vizsgálatainkban a mélyhűtött kossperma minőségét vizsgáltuk néhány hasonló témakörrel foglalkozó kutatók, köztük Gillan és mtsai (1997) mélyhűtött kosspermával történő termékenyítésnek eredményeit is be kell mutatnunk. Az alábbiakból látható, hogy vizsgálataik során mélyhűtött, illetve inkubált szaporító anyaggal egyaránt végeztek termékenyítéseket. Vizsgálataik során 18 -, illetve

50 napos non-return indexet határoztak meg. Így azonban nem lehet kizárni az anyai hatást, különösen a 18 napos non-return index adatai bizonytalanok.

Gillian és mtsai. (1997.) szerint		
Frissen vett hígított		inkubált
inkubálási hőmérséklet, időtartam	frissen vett	37°C, 6h
18. napig nem ivarzott vissza (%)	89,42	76,24
50. napig nem ivarzott vissza (%)	68,27	65,35
Mélyhűtött visszamelegített		inkubált
inkubálás időtartama	frissen visszaolvasztott	37°C, 6h
18. napig nem ivarzott vissza (%)	77,57	71,43
50. napig nem ivarzott vissza (%)	69,16	51,02

12. táblázat: *Frissen vett hígított és mélyhűtött kossperma termékenyítő képességének vizsgálata 6 órán keresztül 37°C-on inkubált kossperma esetén Gillian és munkatársai (1997) szerint*

### 2.8.2. Kapacitációszerű elváltozáson-, akroszóma reakción átesett sejtek arányának meghatározása inkubáció és mélyhűtés után

Gillan a CTC fluoreszcens festési eljárással is vizsgálta a mélyhűtött kossperma kapacitációszerű elváltozáson és akroszóma-reakción átesett sejteinek arányát, azonban az alábbiakban látható, hogy adatsoraik nem teljeseek.



Gillian és munkatársai (1997) szerint:				
Kategóriák	Friss hígított sperma, inkubálás nélkül	37 C-on, 6h-ig inkubált	Mélyhűtött-visszamelegített, inkubálás nélkül	6 h-ig 37° C-on inkubált
Ép membránnal rendelkező "F"	61,30%	5%	6,70%	0,50%
Kapacitációszerű változásokon átesett sejtek aránya "B"	n.a.	54%	65,90%	35,20%
Akroszóma-reakción átesett sejtek aránya "AR"	n.a.	41%	25,90%	64,20%
Termékenyítő képesség			-79°C-on pelletizált: 51,4% -140°C-on pelletizált: 52,1%	

13. táblázat: *Sejtmembrán- és akroszóma állapotának vizsgálata frissen vett-hígított és mélyhűtött-visszamelegített, majd mindezek után 37°C-on 6 órán át inkubált kosspermában Gillian és mtsai. (1997) szerint.*

A szakirodalomban fellelhető még, hogy Gómez és munkatársai (1997) is foglalkoztak az akroszóma-reakción átesett sejtek arányának vizsgálatával. Különböző hőmérsékleteken 30 °C, illetve 39°C inkubálták 1-19 óráig a frissen vett hígított, illetve mélyhűtés után visszamelegített kossperma mintákat. Vizsgálataik során az akroszóma-reakción átesett sejtek arányát határozták meg a kosok testhőmérsékletén (39°C), illetve annál valamivel alacsonyabb hőmérsékleten (30°C) inkubált minták esetében.

Gómez munkatársai (1997) szerint:										
Kategóriák	Frissen vett hígított	inkubált								
		30°C				39°C				
		0,5 h	1 h	4 h	19 h	0,5 h	1 h	4 h	19 h	
Akroszóma-reakción átesett sejtek aránya "AR" (%)	inkubálás előtt	0,5 h	1 h	4 h	19 h	0,5 h	1 h	4 h	19 h	
	16	28	22	36	48	34,5	39	41	57,5	
Kategóriák	Mélyhűtött-visszamelegített	inkubált								
		30°C				39°C				
		0,5 h	1 h	4 h	19 h	0,5 h	1 h	4 h	19 h	
Akroszóma-reakción átesett sejtek aránya "AR" (%)	inkubálás előtt	0,5 h	1 h	4 h	19 h	0,5 h	1 h	4 h	19 h	
	33	64	53,5	46	51	54,5	60	61	64,5	

14. táblázat: Akroszóma-reakción átesett spermiumsejtek arányának vizsgálata frissen vett és hígított, mélyhűtött-visszamelegített különböző hőmérsékleteken és ideig inkubált kosspermában Gómez és mtsai (1997) szerint.

### 2.8.3. Mélyhűtött szaporítóanyag előállításának módszerei és cervikouterinális termékenyítéssel történő felhasználás eredményei

Salamon és Maxwell 1997-ben írt két cikkében számos kutató kossperma mélyhűtési és termékenyítési eredményeit foglalta össze. Az alábbi táblázatban ebből ragadtam ki a disszertációhoz szükséges elvégzett kísérletek során alkalmazott módszerekhez hasonló hígítási-, mélyhűtési technológiákat és a hozzájuk tartozó termékenyítési eredményeket. Az alábbi táblázatban fetűntetett szerzők kossperma mélyhűtési kísérleteik során egyaránt laktóz és tojássárgája alapú hígítót használtak. Ehhez majdnem minden esetben, kisebb-nagyobb arányban krioprotektív anyagként glicerint, illetve analitikai tisztaságú

glicerint adtak. Az előkészítés során nem mindegy azonban a hígítás aránya és az, hogy a glicerinnel történő hígítás egy-, illetve két-, vagy akár több lépésben történik e, illetve hány °C-on kerül hozzáadásra.

A szerzők között előfordulnak még olyanok is nevezetesen Colas és Guérin (1981), akik a mélyhűtés utáni visszaolvasztást követően centrifugálást és főzött tejjel történő újahígítást, majd ezt követően ismételt műszalmába töltést javasolnak. A fenti procedúra után a szaporítóanyagot termékenyítés előtt 2-6 órán keresztül 15°C-on tárolták. Eredményül azt kapták, hogy a centrifugált, majd újra hígított kossperma jobb eredményeket mutatott, mint a kontrol minta. A termékenyítési eredmények függenek a spermavétel és termékenyítés idejétől is. Ez utóbbi főleg természetes ivarzásban történő termékenyítés esetén meghatározó tényező. A termékenyítő anyag kezelésén túl a termékenyítés módja, a természetes ivarzásban történő, illetve prosztaglandin, PMSG, valamint FGA kezelés mellett történő termékenyítés eredményességébe már az anyai hatás is beleszól.

A termékenyítési kísérletek során nem elég ugyanis a termékenyítőanyag minőségének vizsgálata. Az ellési %-ba és a non-return indexbe már az anyai hatás is beleszól. A két mutató közül természetesen az ellési % a megbízhatóbb, mivel a non-return indexet torzíthatják a cikluszavaros, nem időben visszaivarzó anyák és a vetélések.

Természetesen a valódi termékenyítések mellett a Volkov (1968) által végzett in vitro kísérletek is megjelennek. Ezek eredményei még a

non-return indexnél is rosszabb hatásfokúak. Ez azonban az anyai hatást zárja ki elsősorban, mert ez esetben a beágyazódás, illetve az 5 hónapos vemhesség teljes mértékben kimarad a vizsgálati eredményekből.

15. táblázat: Mélyhűtött szaporítóanyag előállítás szakirodalomban előforduló módszerei és a termékenyítő anyaggal végzetttermékenyítés eredményei (Salamon és Maxwell, 1997/a)

Szerző	Higitás aránya	Higitó	Mélyhűtés módszere	Motilis spermiumok száma az inszeminálósór (X10 <sup>6</sup> ), vagy motilis sejtek aránya 1 ml-ben	Inszeminálósók száma	Inszeminálót jerek/anyajuhok	Fertilitási % (báranyozás, visszaivarzás)	Egyéb megjegyzés
Loginova és Zheltobrjuk (1968)	7	Laktóz-tojássárgája	Pelletben	NS	2-3	31	29	-
Platov (1968)	4	Laktóz-tojássárgája	Pelletben	0,2	1-2	45	22	3,5% glicerol
	4	Laktóz-tojássárgája	Pelletben	0,2	1-2	60	22	1,75% etilén-glikol
Volkov (1968)	4	Laktóz-tojássárgája	Pelletben	0,2	2	59	12	in vitro termékenyítés
Colas és Brice (1970)	3	Laktóz-tojássárgája	Műszalmában	190	2	50	60	Ellési %
Kálev és mtsai. (1970)	n.a.	Laktóz-tojássárgája	Pelletben	70-80	2	340	24,1	-
Colas és mtsai. (1971)	3	Laktóz-tojássárgája	Műszalmában	190	2	133	20,3	Ellési % és non-return index, nincs PMSG kezelés
	3	Laktóz-tojássárgája	Műszalmában	190	2	139	49	Ellési% és non-return index, 400 NE PMSG
	3	Laktóz-tojássárgája	Műszalmában	190	2	89	37,1	Non-return index, inszeminálás az ivarzás kezdetén
	3	Laktóz-tojássárgája	Műszalmában	190	2	98	53	Non-return index, inszeminálás az ivarzás kezdete után 12 órával
Andersen és Aamdal (1972)	5-7	Laktóz-tojássárgája	Műszalmában	60-75	2	283	46	-
Colas (1972)	n.a.	Laktóz és tojássárgája	Műszalmában	180	2	133	20,8	Az állatok nem kaptak PMSG kezelést a spongya kivétele után
	n.a.	Laktóz és tojássárgája	Műszalmában	180	2	130	45,2	Az állatok 400NE PMSG-t kapnak a spongya kivétele után
	n.a.	Laktóz és tojássárgája	Műszalmában	180	2	82	57,3	Az anyajuhok/jerek termékenyítése ösztroban 36 órával a spongya kivétele után
	n.a.	Laktóz és tojássárgája	Műszalmában	180	2	76	38,4	Az anyajuhok/jerek termékenyítése ösztroban 48 órával a spongya kivétele után
	n.a.	Laktóz és tojássárgája	Műszalmában	180	2	40	52,2	A spongya eltávolítása 4 nappal a természetes ivarzás után történt
	n.a.	Laktóz és tojássárgája	Műszalmában	180	2	133	26,3	A spongya eltávolítása 5-6 nappal a természetes ivarzás után történt
Nauk és Lansberg (1972)	3-4	Laktóz-tojássárgája	Pelletben	NS	2+3	60	25	2 lépéses higitás alkalmazása a szaporítóanyag előállítása során
	3-4	Laktóz-tojássárgája	Pelletben	NS	2+3	40	22	2 lépéses higitás alkalmazása a szaporítóanyag előállítása során
	3-4	Laktóz-tojássárgája	Pelletben	NS	2+3	102	30,4	2 lépéses higitás alkalmazása a szaporítóanyag előállítása során
Remes (1972)	3	Laktóz-tojássárgája	Pelletben	30-50	1	75	49,3	A mélyhűtött szaporítóanyag tárolása 3 éven át
Milovanov és Gohubj (1973)	n.a.	Laktóz-tojássárgája	Pelletben	NS	NS	56	21,4	A kosok nem kaptak szójazsirt a takarmányban
	n.a.	Laktóz-tojássárgája	Pelletben	NS	NS	61	34,4	A kosok kaptak szójazsirt a takarmányban
	n.a.	Laktóz-tojássárgája	Pelletben	NS	NS	30	33,3	A kosok kaptak szójazsirt a takarmányban
Varnavskij és Turbin (1974)	3-4	Laktóz (13,3%-) tojássárgája	Pelletben, gyors mélyhűtés (20s) -150°C és -160°C közötti hőmérsékleten	150-180	2	29	38	Az ejakulátum tisztítva volt a higitás előtt

Szerző	Higitás aránya	Higitó	Mélyhűtés módszere	Motilis spermiumok száma az inszemináláskor ( $\times 10^6$ ), vagy motilis sejtek aránya 1 ml-ben	Inszeminálások száma	Inszeminált jerek/anyajuhok	Fertilitási % (bárányozás, visszaivarzás)	Egyéb megjegyzés
Colas (1975a)	5	Laktóz-tojássárgája+laktóz glicerol	Műszalmában	180	2	23	35	30°C-on hozzáadott gliceres higitó (4% glicerin-koncentráció)
	5	Laktóz-tojássárgája+laktóz glicerol	Műszalmában	180	2	23	46	4°C-on hozzáadott gliceres higitó (4% glicerin-koncentráció)
	5	Laktóz-tojássárgája+laktóz glicerol	Műszalmában	180	2	91	34	Higitási arány $900 \times 10^6 \text{ ml}^{-1}$
	5	Laktóz-tojássárgája+laktóz glicerol	Műszalmában	180	2	101	25	Higitási arány 1:4
	5	Laktóz-tojássárgája+laktóz glicerol	Műszalmában	180	2	91	38,5	A végleges higitás 2% glicerolt tartalmaz
	5	Laktóz-tojássárgája+INRA glicerol	Műszalmában	180	2	79	55,7	A végleges higitás 4% glicerolt tartalmaz
	5	Laktóz-tojássárgája+laktóz glicerol	Műszalmában	180	2	34	73,5	A végleges higitás 4% glicerolt tartalmaz
	5	Laktóz-tojássárgája+INRA glicerol	Műszalmában	180	2	45	42,2	A végleges higitás 4% glicerolt tartalmaz
	5	Laktóz-tojássárgája+INRA glicerol	Műszalmában	180	2	60	68,3	Termékenyítés természetes ivarzásban, a végleges higitásban 4%-os glicerin koncentráció
Colas (1975b)	5	Laktóz-tojássárgája+INRA glicerol	Műszalmában	180	2	131	20,6	Progesztággal szinkronizált állatok termékenyítése, amelyek PMSG-t nem kaptak
	5	Laktóz-tojássárgája+INRA glicerol	Műszalmában	180	2	133	43,6	Progesztággal kezelt állatok termékenyítése, amelyek a kezelést követően 40NE PMSG-t kaptak
	5	Laktóz-tojássárgája+INRA glicerol	Műszalmában	180	2	145	59,2	Termékenyítési szezonban indukált ivarzás (FGA+PMSG)
	5	Laktóz-tojássárgája+INRA glicerol	Műszalmában	180	2	108	53,7	Anösztrozban indukált ivarzás (FGA+PMSG)
	5	Laktóz-tojássárgája+INRA glicerol	Műszalmában	180	2	99	34,3	FGA-val indukált ösztrozb + PMSG
	5	Laktóz-tojássárgája+INRA glicerol	Műszalmában	180	2	71	63,4	FGA-val indukált ösztrozb + PMSG
Colas és Brice (1975)	Higitás $900 \times 10^6$ sperma $\text{ml}^{-1}$	Laktóz-tojássárgája + Laktóz-tojássárgája - glicerol	Műszalmában	180	2	45	42,2	2 lépésben történő higitás
		Laktóz-tojássárgája+INRA glicerol	Műszalmában	180	2	35	73,5	2 lépésben történő higitás
		Laktóz-tojássárgája+tris-glicerol	Műszalmában	180	2	15	33,3	2 lépésben történő higitás
Bauer és Liebenberg (1976)	n.a.	Laktóz és tojássárgája	Pellet	NS	1		15,2	30 napos non-return index
Colas és Brice (1976)	5	Laktóz-tojássárgája+INRA glicerol	Műszalmában	800	2	56	41	Spermium mélyhűtés tavasszal, tennekyntés ősszel
Platov (1977)	4	Laktóz-tojássárgája	Pellet	0,2	n.a.	n.a.	n.a.	-
Maxwell és mtsai. (1980)	Higitás $900 \times 10^6$	Laktóz-tojássárgája	Műszalmában	450 (0,5)	2	79	56	Fix idős inszeminálást alkalmaztak az ivarzás szinkronizálás után
Colas és Guérin (1981)	Higitás $1,5 \cdot 1,6 \times 10^6 \text{ ml}^{-1}$	Laktóz-tojássárgája + INRA-glicerol	Műszalmában	660	1	112	52,4	A visszaolvasztott spermát centrifugáltak, majd főtözött tejjel újra higitottak, végül újra műszalmába töltötték és 2-6 órán át 15°C-on tárolták az inszeminálás előtt
	Higitás $1,5 \cdot 1,6 \times 10^6 \text{ ml}^{-1}$	Laktóz-tojássárgája + INRA-glicerol	Műszalmában	800	1	113	44,2	Kontroll minta centrifugálás nélkül
Wang és mtsai.	2	Laktóz-tojássárgája	Pelletben	90-120	2-3	1008	50,7	Üzemi kísérletek
Nauk és Boronchuk (1992)	3-4	Laktóz-tojássárgája	n.a.	n.a.	n.a.	209	24,4	-

#### **2.8.4. Mélyhűtött szaporítóanyag előállításának módszerei és méhszarvakba történő mesterséges termékenyítéshez történő felhasználás során kapott termékenyítés eredményei**

Salamon és Maxwell egy 1997-ben publikált összefoglaló tudományos munkájának második részében kiemelten foglalkozik a sebészeti, vagy félsebészeti úton méhszarvakba történő mesterséges termékenyítéshez felhasználható mélyhűtött kossperma előkészítésével, mélyhűtésével, termékenyítés előtti kezelésével, illetve a szaporítóanyag adagolásával.

Mindezen paraméterek hatékonyságát a termékenyítési eredményeken keresztül értékelik a szerzők. Az említett szerzők közül a cikk Maxwell munkásságával foglalkozik a legrészletesebben. Maxwell jelen tudományos munkájában az inszeminálás utáni vemhesülést, illetve az ellési %-ot vizsgálta a mélyhűtött spermával sebészeti, illetve félsebészeti eljárással történő méhszarvakba végzett termékenyítés esetében.

Az eredmények értékelésekor el kell azonban különíteni a termékenyült állatok-, illetve a ténylegesen ellett állatok arányát, azaz az ellési %-ot. Hozzá kell azonban azt is tenni, hogy ez esetben már az anyai hatás is erősen közrejátszik.

Az alábbiakban (16. táblázatban) szereplő Maxwell és munkatársai által kapott termékenyítési eredmények szerepelnek.

- **Termékenyítési eredmények:** A termékenyítési eredményekre jellemző, hogy akár 70% feletti eredmények is elérhetőek. Ez lenne az optimális, annak érdekében, hogy az ellési % is megfelelő legyen.

- **Ellési %:** Az ellési % értékei általában alacsonyabbak az elfogadható értékek 55-60%-os eredmények voltak. Azonban előfordulnak kimagasló 60, sőt 70% feletti eredmények is. A legmagasabb érték, még a termékenyítési eredmények 76%-os eredményénél is magasabb 76,8%.

Quintana Casares és munkatársai (1990) 50 napos NR indexet vizsgáltak, melynek során 40,5-58,1%-os termékenyítési eredményeket kaptak.

Findlater és mtsai (1991) az ejakulátum különböző hígítási arányaival (2-4-szeres hígítás), illetve a termékenyítő anyag különböző adagokban történő használatával (40-160 $\mu$ l) kísérleteztek. Arra a következtetésre jutottak, hogy a nagyobb inszemináló adag, kisebb hígítás összességében jobb eredményeket ad, mivel nagyobb a termékenyítés során használt motilis spermiumok száma. Következtetésként levonhatjuk, hogy a spermaadag módosításával (növeléssel) növekszik a termékenyítés hatékonysága.

Jabbour és Avans (1991) a termékenyítési aránnyal foglalkoztak szuperovuláltatott állatok esetében. Eredményeik nagy szórást mutatnak 26,1% - 98,2%.



16. táblázat: Mélyhűtött szaporítóanyag méhszarvakba történő termékenyítésre előállított szaporító anyag és azzal végzett termékenyítés eredményei (Salamon és Maxwell, 1997/b)

Szerző	Hígító	Hígítás aránya	Mélyhűtés módszere	Motilis spermiumok száma amely inszeminálás-kor a 2 méhszarvba kerül (X10 <sup>6</sup> )	Inszeminált jerek/anyajuhok	Fertilitási % (báránnyozás, visszaivarzás)	Egyéb megjegyzés
Maxwell (1984)	Tris-glükóztojássárgájaglicerinn	3	pelletben	40	837	50,7	A termékenyítéseket 17 különböző nyjában végezték.
Maxwell és Buttler (1984)	Tris-glükóztojássárgájaglicerinn	3	Pelletben	40	365	52,9	Vemhesülés és ellési %
Maxwell és mtsai. (1984a)	Tris-glükóztojássárgájaglicerinn	3	Pelletben	40	61 56 59 60	8,8-25,9 17,6-54,4 50,0-68,0 54,3-76,0	Anyajuhok termékenyítésre alkalmas petesejtekkel (2-3 nap) A vemhes anyajuhok 100 nappal a termékenyítés után vágóhídra kerültek.
Eppleston és Roberts (1986)	Tris-glükóztojássárgájaglicerinn	3	Pelletben	50	41 39 46 41 40 56	31,7 61,5 37 51,2 52,5 62,5	
Maxwell és Barnes (1986)	Tris-glükóztojássárgájaglicerinn	3	Pelletben	20	50 50	54 60	Az ivarzás szinkronizálás vaginális spongyával történt.
Maxwell (1986a)	Tris-glükóztojássárgájaglicerinn	3	Pelletben	20	7 41 111 18 107 6 115 61	71,4* 70,7* 45,9* 72,2* 55,1* 33,3* 57,4* 38,3*	* Inszeminálásonként termékenyített anyajuhok aránya (%) * Inszeminálásonként ellett anyajuhok aránya (%)
Maxwell (1986b)	Tris-glükóztojássárgájaglicerinn	3	Pelletben	0,5 5 10 20 25 50	75 164 85 96 87 103	29,3* 25* 38,8* 53,1* 56,3* 62,1*	*Az inszeminált állatokra vetített ellési %.
				20	75	44,9*	inszeminálás csak az egyik méhszarvba.
				20	69	76,8*	inszeminálás mindkét méhszarvba.
Quintana Casares és munkatársai (1990)	Tris-glükóztojássárgájaglicerinn	200-400x10 <sup>6</sup> spermium ml <sup>-1</sup>	Műszalmában	23,3 39,5 58,6 77,1 104,5	37 63 77 68 31	40,5 52,4 57,1 57,4 58,1	50 napos non-return index.
Findlater és mtsai (1991)	Tris-glükóztojássárgájaglicerinn	3	Pelletben	10,4 20,8 41,6 83,2 23 52,2 104,4 41,6 41,6 52,2 52,2 52,2	44 44 44 44 összesen 929 összesen 999	52 53 56 67 54 59 61 65 63 46 57 55 58	A sperma hígítása 4-szeres, inszemináló adag 80µl A sperma hígítása 2-szeres, inszemináló adag 80µl A sperma hígítása 3-szoros, inszemináló adag 80µl A sperma hígítása 3-szoros, inszemináló adag 160µl A spermadag módosításával növekszik a termékenyítés hatékonysága (Adagolás 40-160µl)
Jabbour és Evans (1991)	Tris-glükóztojássárgájaglicerinn	3	pelletben	50	6 9 10	46,1 98,2 26,1	Megtermékenyítési arány a szuperovulált állatok esetében

### 3. ANYAG ÉS MÓDSZER

A Pharmagene-Farm Kft-nél 2007-2009 közötti időszakban végzett vizsgálatok során a tavaszi és őszi kossperma mennyiségét, minőségét, illetve 2-4°C-os hűtésre, illetve mélyhűtésre való alkalmasságát vizsgáltam hét lacaune kos és egy bakkecske bevonásával. A vizsgálatok során a kosok frissen vett spermamennyiségének, élősejtszámának, illetve a mélyhűtött és visszamelegített sperma élősejtszámának, valamint a kapacitációszerű membránváltozáson és akroszóma-reakción átesett spermiumsejtek arányának meghatározása történt. A mélyhűtés egyes fázisaiban a különböző összetételű dekapacitáló oldatok hatékonyságának meghatározása élősejtszám % meghatározással, valamint a kapacitációszerű elváltozáson, illetve az ép membránnal rendelkező sejtek arányának változásának vizsgálatával, valamint inkubációs kísérletekkel történt.

### **3.1. Vizsgálatba bevont állatok**

#### **3.1.1. Kosok**

- 299
- 4012
- 4045
- 4056
- 4245
- 23144
- 23386

#### **3.1.2. Bakkecske**

- Jimmy 001

### **3.2. Vizsgálatok**

3.2.1. 2-4 °C-on hűtött kossperma hűtés során történő élősejtszám % változásainak membrán- és akroszóma elváltozásainak, illetve termékenyítő képességének vizsgálata 2007. év őszi adatok alapján

3.2.2. Kossperma fázisvizsgálata (membrán- és akroszóma elváltozásainak vizsgálata az előkészítés, mélyhűtés és visszamelegítés során 2008. évi tavaszi adatok alapján

3.2.3. Évszakhatás vizsgálata a mélyhűtésre való alkalmasság tekintetében 2008. tavaszi és 2008. őszi adatok alapján

3.2.4. Dekapacitációs faktorokat tartalmazó visszamelegítő oldatok hatása az élősejtszám %-ra és a dekapacitációra, valamint hőkimerítő próbák során történő alkalmazás 2009. évi adatok alapján

### **3.3. Vizsgálatok módszere**

#### **3.3.1. Fénymikroszkópos vizsgálat**

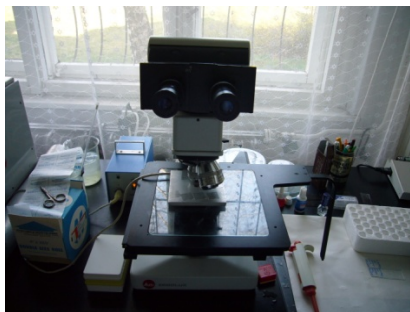
A vizsgálatok során első lépésként fénymikroszkóp segítségével a friss ejakulátum tömegmozgását 5 M – 4 M -3 M- 2 M – 1 M jelzéssel osztályozzuk.

Az ejakulátum sűrűségét ugyancsak kis nagyítással bíráljuk, 5 S - 4 S - 3 S – 2 S -1 S jelzéssel osztályozzuk.

Az egyes ejakulátumok tömegmozgásának és sűrűségének bírálata így összbnyomás alapján kb. 6-10 másodperc időt vesz igénybe. (Gergácz, 2007)

Sűrűség fénymikroszkópos meghatározása és az ejakulátum mennyiségének meghatározása után a hígítás következik.

Majd a visszaolvasztás utáni élősejtszám meghatározás.



1. kép: Fénymikroszkóp



2. kép: Vízfürdő

A mélyhűtés előkészítése során, illetve különböző összetételű oldatokban történő visszamelegítés során történő fluoreszcens festési eljárással történő ép membránnal rendelkező, kapacitációszerű elválzáson, illetve akroszóma-reakción átesett sejtek arányának meghatározását végeztem fluoreszcens fényforrással felszerelt Olympus BHS mikroszkóppal és Hamupipőke nevű sejtszámláló program segítségével. (A módszer részletes leírását ld. 3.3.3 fejezetben.)

### 3.3.2. Mélyhűtésre való előkészítés menete

#### 3.3.2.1. Hígítás két lépésben

-I. hígító: laktóz- tojássárgája

-II. hígító: laktóz-tojássárgája-glicerín (5 °C-on hozzáadva, szakaszosan adagolva)

### 3.3.2.2.Hűtés, előkészítés fázisai

- Testhőmérsékleten hígítás I-es hígítóval
- 20 °C-ra hűtés 1 óra alatt
- 5 °C-ra hűtés 1,5 óra alatt
- II-es hígító hozzáadása
- Equilibráltatás (1-2 óra)



3. kép: 2-4°C-ra történő hűtés

- Pelletálás szárazjégen



4. kép: Szárazjég a felületébe vágjt mélyedésekkel

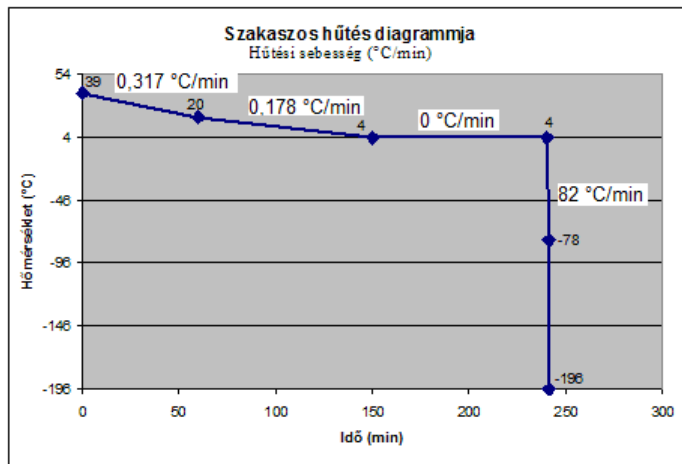
-Folyékony N<sub>2</sub>-be helyezés



5. kép: Folyékony N<sub>2</sub>-t tartalmazó tartály

### 3.3.2.3. Hűtési sebesség

8. ábra: Hűtési sebesség változása a mélyhűtésre való előkészítés során



A fentiek alapján megállapítható, hogy az átlagos hűtési sebesség: kb. 1 °C/min körüli.

#### **3.3.2.4. Mélyhűtés utáni visszamelegítés 3 féle oldatban**

- PBS oldatban
- PBS + spermaplazma (dekapacitáló faktorokat tartalmaz)
- PBS + vérsavó (dekapacitáló faktorokat tartalmaz)

**A vérsavók specikus vizsgálata az alábbi oldatokban történt:**

**Kontrol visszamelegítő oldat:** PBS (foszfát puffer oldat)

#### **1. visszamelegítő oldat (dekapacitáló faktorokat tartalmaz):**

PBS (foszfát puffer oldat) + kossperma plazma

#### **2. visszamelegítő oldat (dekapacitáló faktorokat tartalmaz):**

PBS (foszfát puffer oldat) + anyajuhtól származó vérsavó

(fűlszám: 8181)

#### **3. visszamelegítő oldat (dekapacitáló faktorokat tartalmaz):**

PBS (foszfát puffer oldat) + anyajuhtól származó vérsavó

(fűlszám: 8211)

#### **4. visszamelegítő oldat (dekapacitáló faktorokat tartalmaz):**

PBS (foszfát puffer oldat) + kostól származó vérsavó (fűlszám: 4245)

#### **5. visszamelegítő oldat (dekapacitáló faktorokat tartalmaz):**

PBS (foszfát puffer oldat) + kostól származó vérsavó (fűlszám: 4056)



## **6. visszamelegítő oldat (dekapacitáló faktorokat tartalmaz):**

PBS (foszfát puffer oldat) + kostól származó vérsavó (fűlszám: 4012)

### **3.3.3. Kapacitációszerű elváltozáson és akroszóma-reakción átesett sejtek arányának meghatározása CTC fluorescens festési eljárással**

Az elvégzett vizsgálatok során a spermiumsejtek akroszóma reakciójának és kapacitációszerű elváltozásának meghatározására a Gillian és munkatársai (1997) által publikált CTC fluorescens festési eljárást alkalmaztam, amely a következő:

A CTC festési eljáráshoz szükséges festéket frissen kell előkészíteni. A festéshez használt oldat 750  $\mu\text{mol}$  CTC-HCl-t tartalmazott. Az oldat készítéséhez pufferként Tris, NaCl-t és alfa-ciszteint is szükséges adagolni. A szűréshez 0,2  $\mu\text{m}$ -es szűrő (filtert) használtam. A oldat pH-ját 7,8-ra állítottam be. Az oldatot tárolása 4°C-on történt.

A festés során szobahőmérsékleten 45 $\mu\text{l}$  hígított spermamintát fénytől védett küvettába helyeztem, majd ugyanannyi térfogatú CTC-HCl (klór-tetraciklin-hidroklorid) festő oldatot adtam hozzá. Ezután 30 s alatt tökéletesen összeráztam. Végül 10 $\mu\text{l}$  guaraldehydet adtam hozzá.

Az így elkészített oldatból 10 $\mu\text{l}$  tiszta mikroszkóp tárgylemezre helyeztem, majd 10 $\mu\text{l}$  glicerinben oldott és foszfát pufferrel adalékolt 1,4-diazabicyclo (2.2.2) oktánt adtam hozzá annak érdekében, hogy

megvédje a fény káros hatásától. Végül fedőlemezeket helyeztem a mintára. A felesleges folyadékot a tárgylemez és a fedőlemez összenyomásával távolítottam el. Végül a fedőlemez szélét színtelen körömlakkal lelakkoztam. Az elkészített oldatból az összes tárgylemezen 3 cseppet helyeztem el. A minták bírálata során 4 tárgylemezt vizsgáltam. Tárgylemezenként összesen 200 spermiumsejtet soroltam a három festődési kategória (ép membránnak rendelkező, kapacitáción átesett, akroszóma-reakción átesett) valamelyikébe. A vizsgálatot 100-szoros nagyítással fluoreszcens fényforrással ellátott Olympus BHS mikroszkóp alatt végeztem.

A bírálat során a spermiumsejteket 3 kategóriába sorolták:

- „F”: azonos fej fluoreszkálás, amely a nem kapacitált, sértetlen akroszómájú spermiumsejtekre jellemző. (Ép membránnak rendelkező sejtekre jellemző.)
- „B”: halványan fluoreszkáló fej és a rendhagyó sávós mintázat a kapacitációszerű változáson átesett sejtekre jellemző.
- „AR”: fluoreszkáló akroszóma az akroszóma-reakción átesett spermiumsejtekre jellemző.

A spermiumsejt középső része bármely kategóriában megtartja fényesen fluoreszkáló (világító) képességét.

A CTC fluoreszcens festési eljárás segítségével az alábbiakban látható három kategória különíthető el:

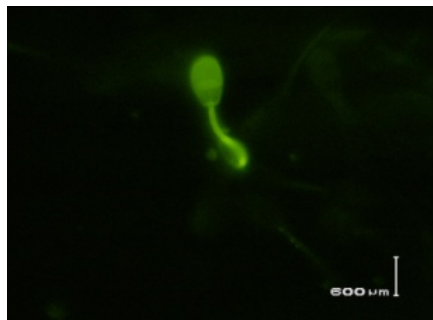
6. kép: *Ép membránnal rendelkező spermiumsejtek „F”*



7. kép: *Kapacitációszerű elváltozáson átesett spermiumsejtek „B”*



8. kép: *Akroszóma-reakción átesett spermiumsejtek „AR”*



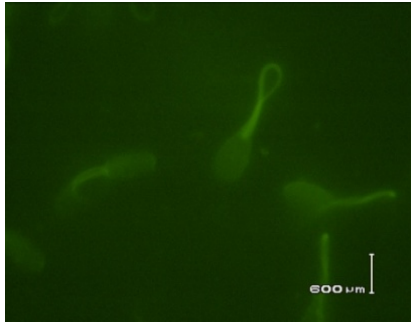
### **3.3.3.1. Mélyhűtés során-, valamint a női nemi utakban bekövetkező változások**

Mélyhűtés hatására a spermiumok egy része átesik a kapacitációszerű elváltozáson és az akroszóma-reakción, amelynek idő előtti (a nőivarú állatok ivarútjaiba kerülése előtti) elváltozása kedvezőtlen hatást gyakorol azok termékenyítő képességére. A kapacitációszerű reakció egy a visszaolvasztás során dekapacitáló faktorokkal visszafordítható folyamat, az akroszóma-reakció viszont visszafordíthatatlan. Természetesen a két folyamat elengedhetetlenül szükséges a megtermékenyítéshez, de fontos, hogy azok megfelelő helyen és időben történjenek, ezért szükséges a mélyhűtési eljárás során a kapacitációszerű elváltozás és akroszóma-reakció lehető legkisebb mértékűre csökkentése, illetve a visszamelegítést követően a dekapacitáló oldatok használata, hogy ennek segítségével a kapacitációszerű elváltozásokat visszafordíthassuk.

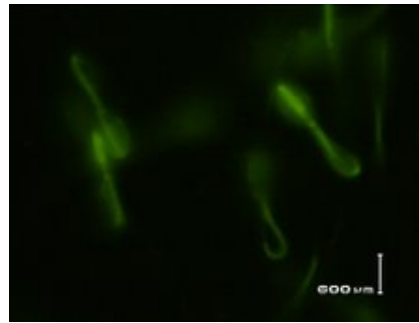
#### ***3.3.3.1.1. Kapacitáció***

A kapacitáció folyamata a női ivarutakban történik. Időtartama 5 – 8 óra. Összetett folyamat, mely elengedhetetlen a spermiumok megtermékenyítő képességének kialakulásához. Kapacitáció hiányában az akroszóma-reakció nem váltható ki. A kapacitáció egy reverzibilis folyamat. A spermium plazmamembránját maszkírozó glikoprotein, az. ún. antikapacitációs faktor eltávolítása. A sejtbe hidrogénkarbonát ionok vándorolnak, s aktiválják az adenilciklázt. A plazmamembrán lipid- és glikoprotein összetétele módosul,

hiperpolarizálódik. Fokozódik a sejt anyagcseréje, és mozgékonyága (hipermotilitás); hiperpolarizálódik. (Dobozy,2007)



9. kép: Ép membránnal rendelkező sejtek

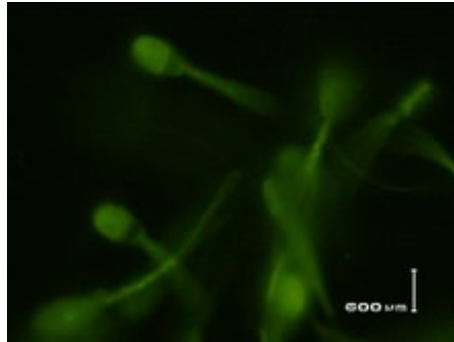


10. kép: Kapacitációszerű változáson átesett sejtek

### 3.3.3.1.2. Akroszóma-reakció

A zona pellucida ZP3 molekulája (az ún. spermium-receptor) felelős az azonos fajú spermiumok megkötődéséért, és ezzel az akroszóma-reakció kiváltásáért. A spermium a plazmamembránjában található galaktozil-transzferázzal kapcsolódik a ZP3-hoz. Az akroszóma-reakciót a spermiumsejtek a ZP3-hoz való kötődése váltja ki. A kapcsolat hatására a spermium sejten belüli  $\text{Ca}^{2+}$ -koncentrációja megnő (a  $\text{Ca}^{2+}$ -ionok részben a sejten belüli raktárakból szabadulnak fel, részben pedig az extracelluláris térből áramlanak a sejtbe). A  $\text{Ca}^{2+}$ -koncentráció növekedése kiváltja az akroszóma vezikulum exocitózisát. Az akroszómából különböző enzimek, elsősorban proteázok szabadulnak fel, melyek a zona pellucida anyagait elbontják, lehetővé téve ezzel, hogy a spermium közelebb kerüljön a petesejt plazmamembránjához. Az akroszóma-reakció révén az

akroszóma eredeti belső membránfelszíne a sejt felszínére kerül, ezzel új membránfehérjék válnak hozzáférhetővé. Az így felszínre került membránfehérjék specifikusan kapcsolódnak a zona pellucida ZP2 glikoproteinjához. Ez a kapcsolat előfeltétele a petesejt és a spermium plazmamembránja közötti fúzióknak. (Dobozy, 2007.)



11. kép: Akroszóma-reakción átesett spermiumsejtek

### ***3.3.3.1.3. A kapacitáció és az akroszóma-reakció szerepe a megtermékenyítés folyamatában Dobozy, 2007 szerint***

#### **A megtermékenyítés folyamata**

- 1.) A spermiumok kapacitációja
- 2.) Áthatolás a corona radiátán
- 3.) A spermium kapcsolódása a petesejt zona pellucidájához.
- 4.) Az akroszóma-reakció kialakulása
- 5.) A spermium áthaladása a zona pellucidán
- 6.) A spermium és a petesejt plazmamembránjának fúziója.
- 7.) Polispermia (többszörös megtermékenyítés) gátlása

(Dobozy, 2007)

#### ***3.3.3.1.4. A mélyhűtés hatására különböző elváltozáson átesett sejtek arányának meghatározása Hamupipőke számláló program segítségével***

A CTC fluoreszcens festési eljárással festett különböző elváltozásokon átesett sejtek (ép membránnal rendelkező, kapacitációszerű elváltozáson, illetve akroszóma-reakción átesett sejtek számlálásához a Hamupipőke DOS 1.0 számlálóprogramot használtam. A programot egyébként mikroszkópos számlálás megkönnyítése érdekében Kiss Attila hozta létre. Amikor egy adott időben több kategóriába kell besorolni a mikroszkópos képen látott sejteket, mint például a Kovács-Foote festés esetén (amely hét festődési kategóriát különböztet meg az akroszóma, illetve a sejt mozgása, illetve élő/elhalt állapota alapján) a számlálást jelentősen megkönnyíti, a sejtszámláló berendezés használata. A program alkalmas a CTC fluoreszcens festési eljárással festett 3 kategóriába sorolható spermiumsejtek számlálására is.

A DOS, illetve Windows alatt működő program a klaviatúra Num Pad billentyűinek paraméterezésével teszi lehetővé a festés értékelésénél a kategóriánkénti manuális adatbevitelt. A számítógép minden kategória esetén a billentyű lenyomásakor más és más hangot ad, így a számlálás alatt az operátor folyamatosan végezheti a mikroszkópos megfigyelést. A program számára a futtatás előtt meghatározható, hogy adott sejtszámot rendezzen-e a kategóriákba (ez esetben az adott sejtszám elérésekor a számlálás befejeződik), vagy az operátor állítsa-e le a számlálást. Az ismétlések száma szintén előre megadható. Az

adatbevitel a képernyőn megfigyelhető, a számlálók minden egyes adat bevitele esetén kategóriánként változnak. A számlálás befejeztével a program a kategóriák szerinti átlageredményeket százalékban a szórással együtt olyan output formában menti el, ami az Excel táblázatkezelő program számára könnyen konvertálható, és lehetővé teszi a további statisztikai elemzést.

### **3.3.4. Évszakhatás vizsgálata**

A Pharmagene-Farm Kft-nél végzett vizsgálatok során a tavaszi és őszi kossperma mennyiségét, minőségét, illetve mélyhűtésre való alkalmasságát vizsgáltam. A vizsgálatba hét lacaune kost vontam be, melyek frissen vett spermájának mennyiségét, élősejtszámát, illetve mélyhűtött és visszamelegített sperma élősejtszámát és az előkészítés mélyhűtés egyes fázisaiban membránjának és akroszómájának állapotát vizsgáltam.

A membrán és akroszóma elváltozásainak festésénél Gillian és munkatársai (1997) által leírt CTC fluoreszcens festési eljárást alkalmaztam. Az elváltozásokat grafikonokon ábrázoltam a pelletált formában történő mélyhűtésre való előkészítés egyes fázisaiban és a különböző összetételű oldatokban történő visszamelegítés után. Az előkészítés során 39°C-on történik a friss sperma hígítása, majd az ezt követő 1 órában a 20°C-ra hűtés, aztán 1,5 óra alatt az 5°C-ra hűtés, majd a fagyásvédő (krioprotektív) anyagot tartalmazó hígító szakaszos hozzáadása, végül a szárazjégen, -78°C-on történő pelletizálás, majd folyékony nitrogénbe helyezés. A visszamelegítő oldatok a kontrol



oldatként szolgáló PBS (foszfát puffer oldat), valamint a dekapactiáló faktorokat tartalmazó PBS (foszfát puffer oldatok) oldatok, amelyek adalékanyagként spermaplazmát, illetve vérsavót tartalmaznak. A dekapactiáló faktorokat a mélyhűtés során bekövetkezett még visszafordítható kapacitációszerű elváltozások visszafordítására alkalmaztam.

### **3.3.5. Dekapacitáció vizsgálata**

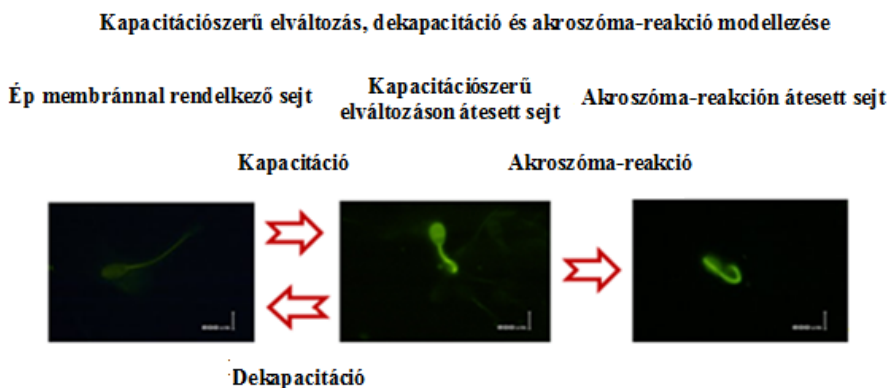
2007-2009 között végzett vizsgálataim során a cél a mélyhűtési eljárás optimalizálása volt. Az ehhez szükséges vizsgálatokat a Pharmagene-Farm Kft., Biotechnikai Állomás telephelyén a Kft. tulajdonában lévő törzstenyészet tenyészkos állományának szaporító anyagából végeztem el. A vizsgálatokat mélyhűtésre való előkészítés, több fázisú hígítás, szakaszos hűtés, illetve PBS foszfátpuffert tartalmazó oldatban, valamint dekapactiáló faktorokat tartalmazó oldatokban történő visszamelgítés során végeztem. A dekapactiáló faktorokat tartalmazó oldatok a PBS-en kívül spermaplazmát, illetve különböző anyajuhok és kosok vérsavóját tartalmazták.

#### **3.3.5.1. Dekapacitáció mértékének meghatározása**

A mélyhűtés után különböző oldatokban visszamelegített szaporító anyag minták esetében akkor beszélhetünk dekapacitációról, ha az adott mintákban az ép membránnal rendelkező sejtek aránya növekszik a kapacitációszerű elváltozáson átesett sejtek aránya pedig

csökken a dekapacitáló faktorokat tartalmazó oldatban történő visszamelegítés hatására.

9. ábra: Kapacitációszerű elváltozás, dekapacitáció és akroszóma-reakció modellezése



A különböző kategóriákba tartozó sejtek számának változására vonatkozó összefüggések a kapacitációszerű elváltozás, dekapacitáció és akroszóma-reakció határásra.

A kapacitáció, dekapacitáció, illetve akroszóma-reakció egymás mellett folyamatosan és dinamikusan zajló folyamatok. A kapacitáció és dekapacitáció folyamata dekapacitáló faktorokkal valamely mértékben irányítható, az akroszóma-reakció viszont nem.

Különböző kategóriákba tartozó sejtek arányának változása a kapacitációszerű elváltozás, a dekapacitáció és az akroszóma-reakció hatására			
Folyamat	Ép membránnal rendelkezők száma	Kapacitációszerű elváltozáson átesettek száma	Akroszóma-reakción átesett sejtek száma
Kapacitációszerű elváltozás következtében	csökken	nő	nem változik
Dekapacitáció következtében	nő	csökken	nem változik
Akroszóma-reakció következtében	Közvetett értelemben csökkenhet, de közvetlenül nem változik	csökken	nő

*17. táblázat: Különböző kategóriákba tartozó sejtek arányának változása a kapacitációszerű elváltozás, a dekapacitáció és az akroszóma-reakció hatására*

A kapacitáción átesett sejtek aránya azért is csökkenhet, mert azok átesnek az akroszóma-reakción, amely már egy vissza nem fordítható folyamat. Ebből következik, tehát, hogy az ép membránnal rendelkező sejtek arányának legalább annyival kell növekednie, mint amennyivel a kapacitációszerű változáson átesett sejtek száma csökken, mivel csak ekkor következik be dekapacitáció. Ellenkező esetben az akroszóma-reakció fokozódásáról van szó, amely a termékenyítésre szánt minták egyre fokozódó romlásához vezet.

### **3.3.6. Inkubációs kísérletek**

Az inkubációs kísérleteket a mélyhűtés után visszaolvasztott kosspermával végeztem 2 órán keresztül 39°C-on. Az inkubáció (hőkimerítő próba) során a minták a visszaolvasztáskor is használt különböző visszamelegítő oldatokban voltak. A vizsgálatokat 3 kostól

(4245, 4056, 23386) vett minták 7-7 mintával végeztem. A minták hígítás utáni élősejtszámát a vizsgálat előtt rögzítettem. A vizsgálat kezdetekor az élősejtszám% 70% volt.

### 3.3.7. Termékenyítés

Jelen esetben a termékenyítés kizárólag frissen vett hígított, illetve 1-2 napos 2-4°C-os hűtve tárolást követően történt.

A visszamelegítés utáni cervikouterinális módszerrel történő termékenyítés kizárólag megfelelő minőségű 60-65%-os élősejtszámmal rendelkező spermával végezhető eredményesen, ha viszont a visszaolvasztott termékenyítőanyag 35-45% közötti élősejtszámmal rendelkezik, akkor a termékenyítés kizárólag sebészeti, vagy félsebészeti úton lehet eredményes.



*12. kép: Inszeminálás cervikouterinális módszerrel*

## **4. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK**

### **4.1. 2007-es vizsgálatok eredményei**

2007. év őszén a különböző kosok szaporító anyagainak frissen vett, hígított, illetve 2-4°C-on való tárolás során történő vizsgálatát végeztem el. A vizsgálatok között szerepelt fénymikroszkóppal végzett élősejtszám meghatározás, CTC fluoreszcens festési eljárással történő ép membránnal rendelkező kapacitációszerű elváltozáson, illetve akroszóma-reakción átesett sejtek arányának meghatározása, valamint a különböző kosok szaporító anyagának tesztelése termékenyítésre való felhasználás során. Ezen vizsgálatnál külön értékeltük a kísérletekhez felhasznált szaporító anyaggal végzett termékenyítések sikerességét, amelynél meglepő módon jobb eredményt kaptunk, mint a napi gyakorlat során felhasznált termékenyítőanyag esetében. A termékenyítéseket cervikouterinális módszerrel, módosított Milovanov-féle termékenyítő katéterrel végeztük. A felhasznált szaporítóanyag frissen vett hígított, valamint 2-4°C-on hűtött kossperma volt. A termékenyítések napjában két alkalommal a reggeli, valamint a délutáni órákban történtek.

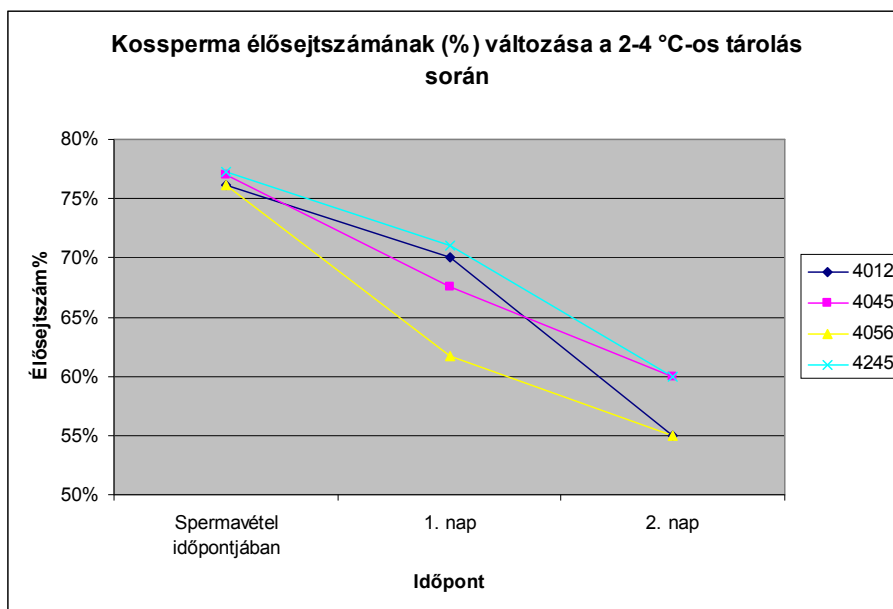
#### **4.1.1. Hígított 2-4°C-on hűtött szaporítóanyag élősejtszám % eredményei 2007.**

Az élősejtszám % meghatározását először közvetlenül a spermavétel után végeztem, majd az 1, illetve 2 napos 2-4 °C-on történő tárolás után. Az eredményeket az alábbi táblázatok és grafikonok tartalmazzák.

18. táblázat: Kossperma élősejtszámának % változása 2-4 °C-os tárolás során

Kossperma élősejtszámának % változása a 2 - 4°C-os tárolás során						
Kos száma	4012	4045	4056	4245	átlag	szórás
Napok	Élősejtszám %					
Spermavétel időpontjában	76,15%	77,00%	76,15%	77,27%	76,64%	0,58%
1. nap	70,00%	67,50%	61,67%	71,00%	67,54%	4,18%
2. nap	55,00%	60,00%	55,00%	60,00%	57,50%	2,89%

1. diagram: Kossperma élősejtszámának % változása 2-4 °C-os tárolás során



A vizsgálat eredményeképpen megállapítható, hogy a vizsgált négy kos mintáinak eredményei közül a két napos 2-4°C-on történő tárolást

követően két kos, nevezetesen a 4045 és 4245-ös kos szaporító anyagának élősejtszám % átlageredményei alapján 60%-os eredmény volt mérhető, amely azt jelenti, hogy a szaporító anyag általában 2 napos 2-4°C-os tárolás után is mesterséges termékenyítésre alkalmas.

#### **4.1.2. Hígított 2-4°C-on hűtött szaporítóanyag eredményei sejtmembrán és akroszóma állapotának 2007. évi vizsgálati eredményei**

A CTC fluoreszcens festési eljárással végzett sejtmembrán és akroszóma vizsgálatnál azonban a 4056-os állat szaporítóanyag bizonyult legjobbnak. A két vizsgálatot összevetve azonban mégis kijelenthetjük, hogy a 4056-os kos termékenyítő anyagával való cervikouterinális termékenyítésre csupán 1 napos 2-4 °C-os tárolás után javasolható. A 4012, illetve 4045-ös kosok mintáinak átlageredményei esetében szintén a maximum 1 napos 2-4°C-os hűtés utáni termékenyítés javasolható. A 4245-ös minta átlageredményei alapján azonban csupán a frissen hígított spermával történő termékenyítés javasolható, ugyanis a membrán fluoreszcens vizsgálatok eredményei alapján a 4245-ös kos szaporító anyaga bírta a legkevésbé a 2-4°C-on történő hűtve tárolást. Esetében, ha hűtve tárolásra kerül sor mindenképpen a hígítás során hozzáadott dekapacitáló faktorok használatára van szükség. A legkézenfekvőbb spermavétel után a hígítás előtt közvetlenül 20 V%-os arányban hozzáadott spermaplazma, amely az eredmények javítása céljából az összes többi mintánál is javasolható. Mindemellett magasabb arányú

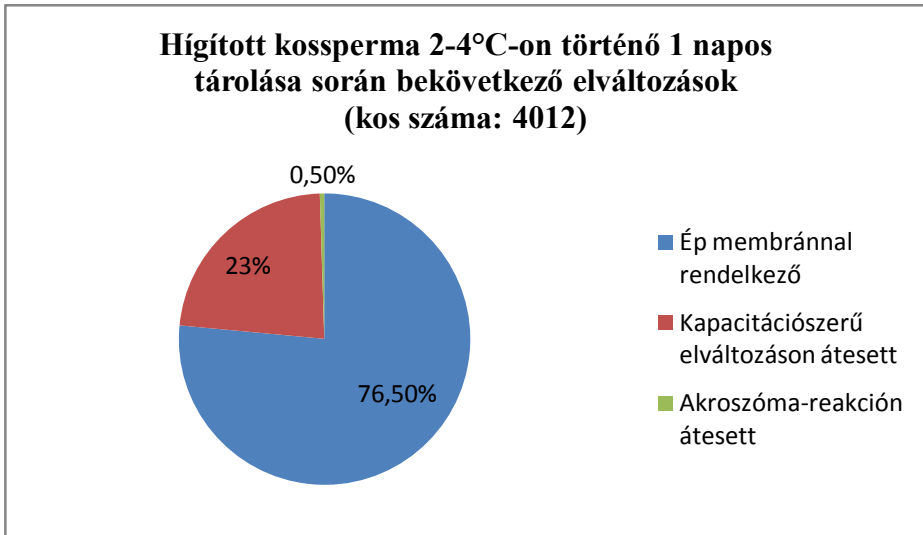
szénhidrát fruktóz, laktóz, gumiarábikum formájában történő hozzáadása a hígítóhoz.

*19. táblázat: Hígított kossperma 2-4 °C-on történő tárolása során bekövetkező elváltozások vizsgálata (kos száma: 4012)*

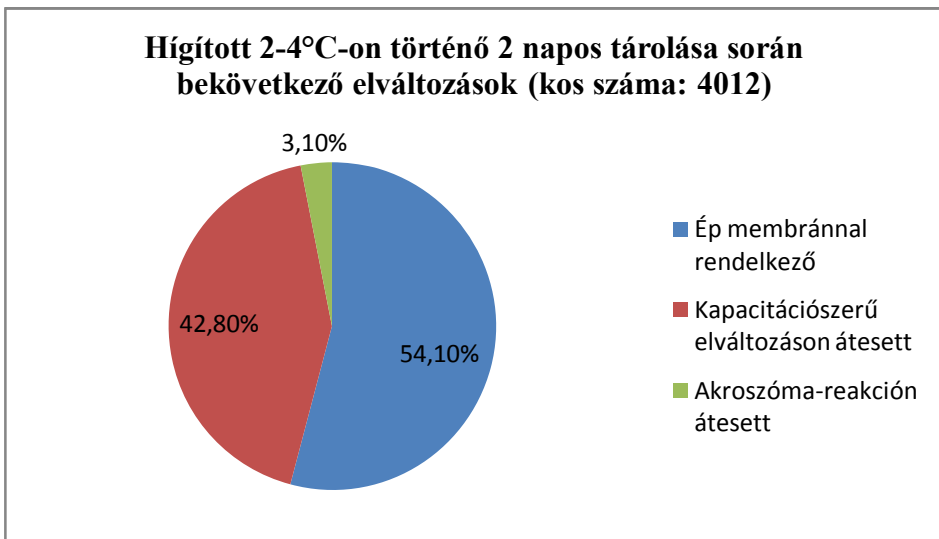
Hígított kossperma 2-4 °C-on történő tárolása során bekövetkező elváltozások vizsgálata (kos száma: 4012)				
Időtartam	Minták	Ép membránnal rendelkező	Kapacitációszerű elváltozáson átesett	Akroszóma-reakción átesett
1. nap	1. minta	85	15	0
	2. minta	54	45	1
	3. minta	93,5	6,5	0
	4. minta	73,5	25,5	1
	átlag	76,5	23	0,5
	szórás	17,1	16,6	0,6
2. nap	1. minta	76,5	21	2,5
	2. minta	51,5	42,5	6
	3. minta	39	58,2	2,5
	4. minta	49,5	49	1,5
	átlag	54,1	42,8	3,1
	szórás	15,9	15,9	2



2. diagram: Hígított kossperma 2-4°C-on történő 1 napos tárolása során bekövetkező elváltozások (kos száma: 4012)



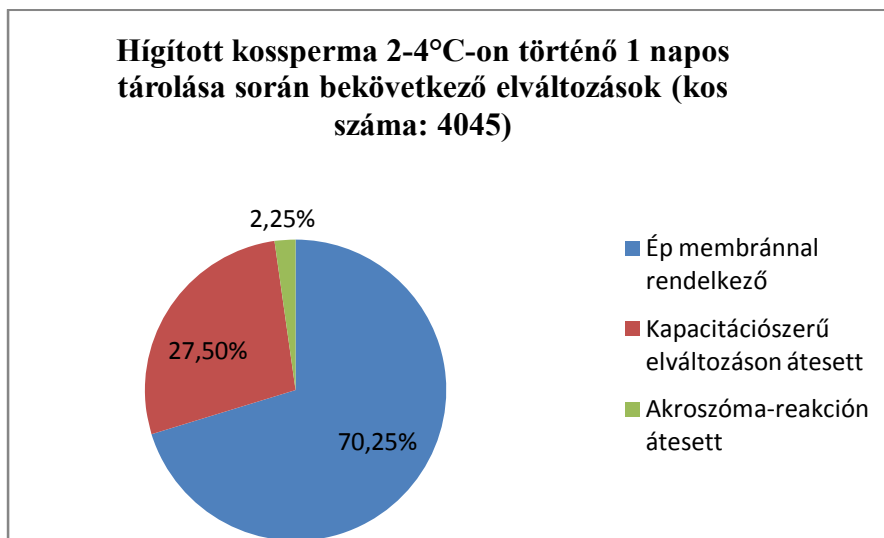
3. diagram: Hígított 2-4°C-on történő 2 napos tárolása során bekövetkező elváltozások (kos száma: 4012)



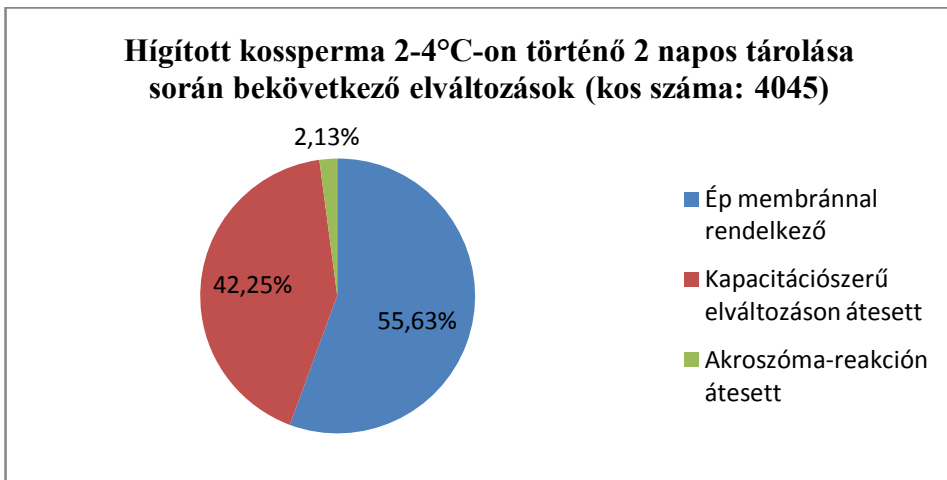
20. táblázat: Hígított kossperma 2-4°C-on történő tárolása során bekövetkező elváltozások vizsgálata (kos száma: 4045)

Hígított kossperma 2-4°C-on történő tárolása során bekövetkező elváltozások vizsgálata (kos száma: 4045)				
Időtartam	Minták	Ép membránnal rendelkező	Kapacitációszerű elváltozáson átesett	Akroszóma-reakción átesett
1. nap	1. minta	72	27	1
	2. minta	65,5	31	3,5
	3. minta	79,5	17	3,5
	4. minta	64	35	1
	átlag	70,25	27,5	2,25
	szórás	6,946642	7,72442	1,443376
2. nap	1. minta	46,5	52	1,5
	2. minta	53,5	43,5	3
	3. minta	61	37,5	1,5
	4. minta	61,5	36	2,5
	átlag	55,625	42,25	2,125
	Szórás	7,099002	7,26292	0,75

4. diagram: Hígított kossperma 2-4°C-on történő 1 napos tárolása során bekövetkező elváltozások (kos száma: 4045)



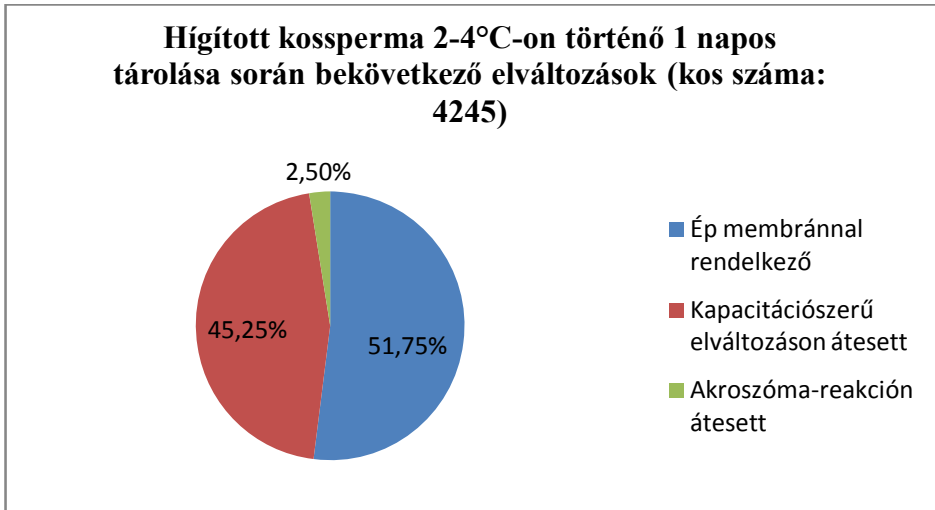
5. diagram: Hígított kossperma 2-4°C-on történő 2 napos tárolása során bekövetkező elváltozások (kos száma: 4045)



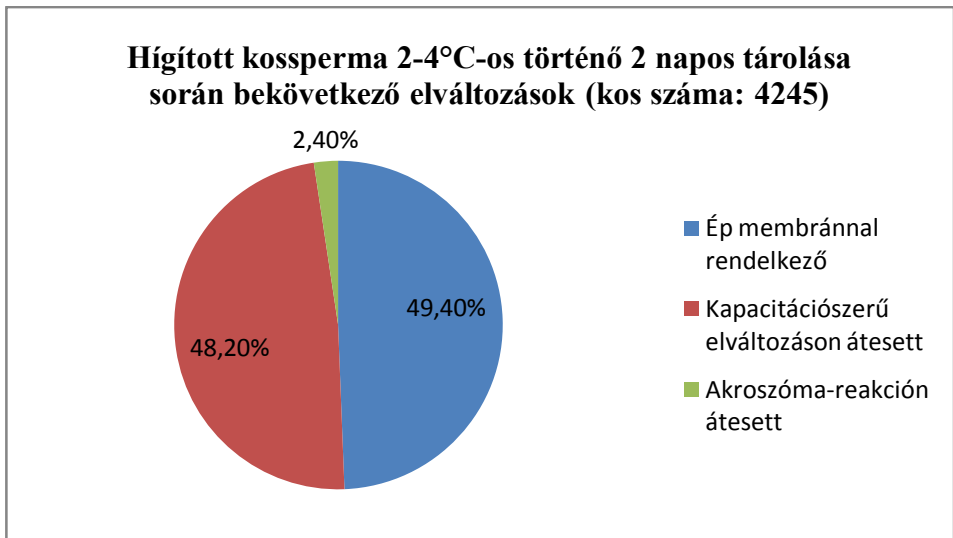
21. táblázat: Hígított kossperma 2-4°C-on történő tárolása során bekövetkező elváltozások vizsgálata (kos száma: 4245)

Hígított kossperma 2-4°C-on történő tárolása során bekövetkező elváltozások vizsgálata (kos száma: 4245)				
Időtartam	Minták	Ép membránnal rendelkező	Kapacitációszerű elváltozáson átesett	Akroszóma-reakción átesett
1. nap	1. minta	49	46	5
	2. minta	52	47	0
	3. minta	47	50	2,5
	4. minta	59	38	2,5
	átlag	51,75	45,25	2,5
	szórás	5,5	5,3	2
2. nap	1. minta	48	50	2
	2. minta	54	41	4,5
	3. minta	44	53	2,5
	4. minta	51	48,5	0,5
	átlag	49,4	48,2	2,4
	szórás	4,5	5,3	1,7

6. diagram: Hígított kossperma 2-4°C-on történő 1 napos tárolása során bekövetkező elváltozások (kos száma: 4245)



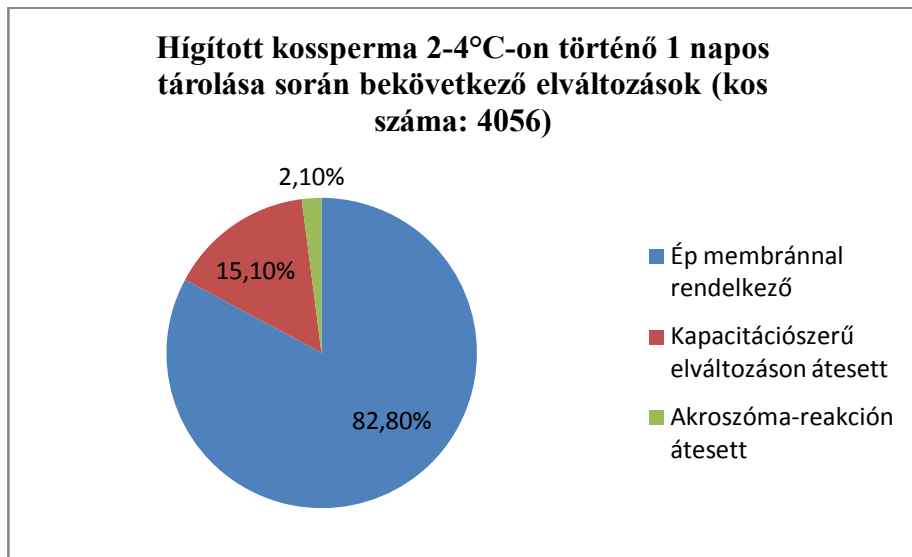
7. diagram: Hígított kossperma 2-4°C-os történő 2 napos tárolása során bekövetkező elváltozások (kos száma: 4245)



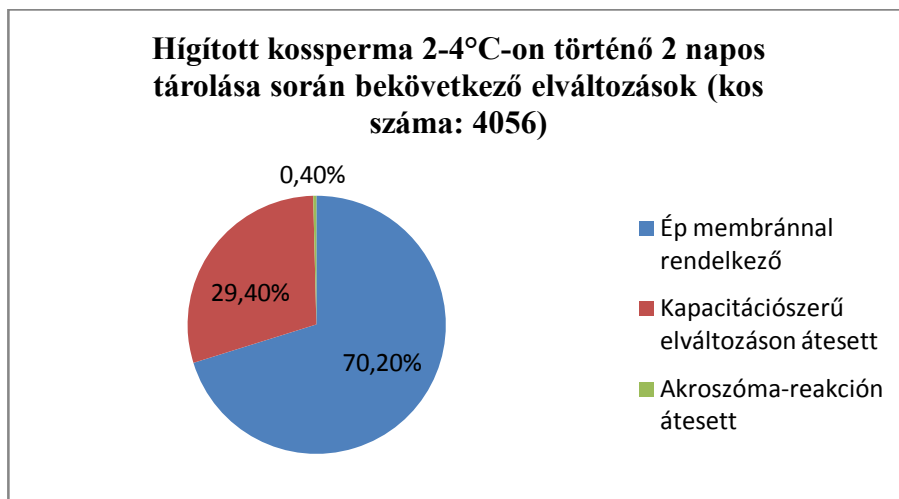
22. táblázat: Hígított kossperma 2-4°C-on történő tárolása során bekövetkező elváltozások vizsgálata (kos száma: 4056)

Hígított kossperma 2-4°C-on történő tárolása során bekövetkező elváltozások vizsgálata (kos száma: 4056 )				
Időtartam	Minták	Ép membránnal rendelkező	Kapacitációszerű elváltozáson átesett	Akroszóma-reakción átesett
1. nap	1. minta	78	17,5	4,5
	2. minta	71,5	25,5	3
	3. minta	98,5	1,5	0
	4. minta	83	16	1
	átlag	82,8	15,1	2,1
	szórás	11,5	10	2
2. nap	1. minta	63	37	0
	2. minta	67	33	0
	3. minta	80,5	19,5	0,5
	4. minta	71	28	1
	átlag	70,2	29,4	0,4
	szórás	7,3	7,5	0,5

8. diagram: Hígított kossperma 2-4°C-on történő 1 napos tárolása során bekövetkező elváltozások (kos száma: 4056)



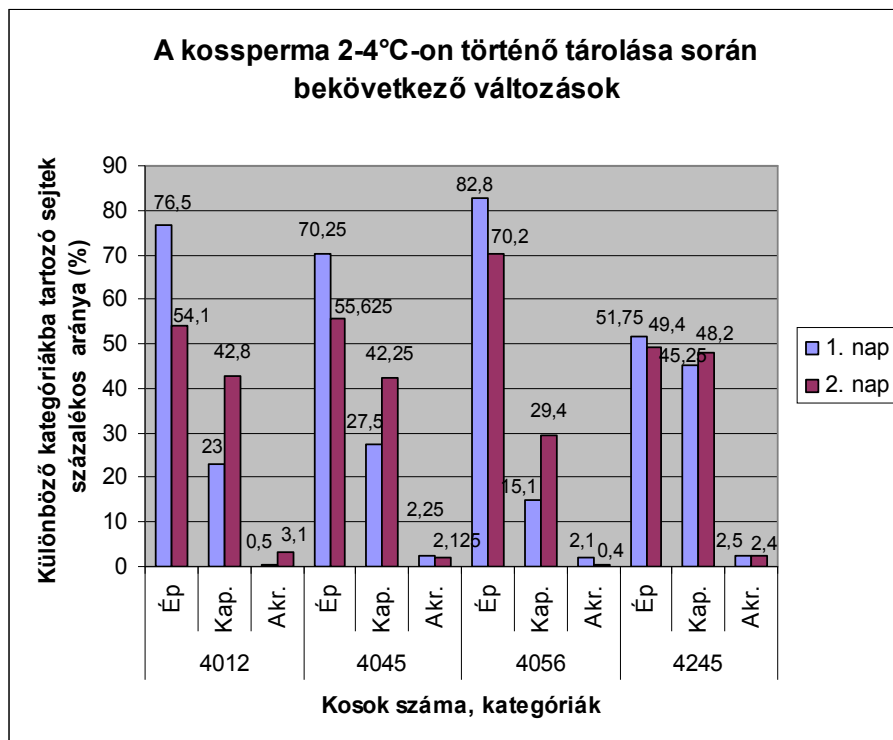
9. diagram: Hígított kossperma 2-4°C-on történő 2 napos tárolása során bekövetkező elváltozások (kos száma: 4056)



23. táblázat: A kossperma 2-4°C-on történő tárolása során bekövetkező változások

Kos száma	4012			4045			4056			4245		
Napok	Ép	Kap.	Akr.	Ép	Kap.	Akr.	Ép	Kap.	Akr.	Ép	Kap.	Akr.
1. nap	76,5	23	0,5	70,3	27,5	2,3	82,8	15,1	2,1	51,75	45,25	2,5
2. nap	54,1	42,8	3,1	55,6	42,3	2,1	70,2	29,4	0,4	49,4	48,2	2,4

10. diagram: A kossperma 2-4°C-on történő tárolása során bekövetkező változások



#### 4.1.3. Hígított 2-4°C-on hűtött szaporítóanyaggal történő sikeres termékenyítések százalékos arányának 2007. évi eredményei

A hígított 2-4°C-on hűtött kosspermával történő az állományban történő sikeres termékenyítések száma (ellési %) a nem kísérleti-kizárólag tenyésztési célból termékenyített kezeletlen anyajuhokon végrehajtott termékenyítések esetében a 2007-es évben állományszinten 61,59% volt. Érdekes megfigyelni, hogy a kísérletek során termékenyített, illetve ivarzásszinkronizált állatok esetében ez

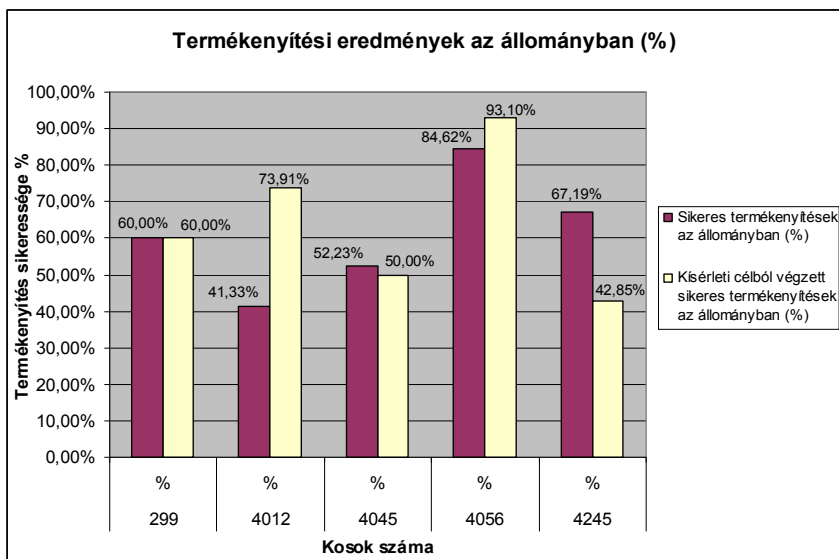
az arány 70,58%. Valószínűleg mindezt a vizsgálatban részt vevő kisebb egyedszám és a kísérletek végzésekor még a szokásosnál is gondosabban végzett munka eredményezi. Ellési % tekintetében a 4245-ös, 4056-os, illetve 299-es kosok szaporítóanyaga bizonyult leghatékonyabbnak. A kísérleti termékenyítések esetében azonban a 4012-es kos szaporítóanyaga jelentősen jobb eredményt ért el ellési% tekintetében. Összességében elmondható, hogy az átlag feletti eredmények jónak mondhatóak. A kísérleti termékenyítések estében pedig a szokásosnál is gondosabb munka és nagyobb odafigyelés még jobb eredményt hozott.



*24. táblázat: Hígított 2-4°C-on hűtött szaporítóanyaggal  
történő sikeres termékenyítések százalékos arányának 2007.  
évi eredményei*

2007. termékenyítés friss spermával					
Kos száma	299	4012	4045	4056	4245
Termékenyítések száma (sikeres termékenyítés/ termékenyítések száma összesen)	3/5	31/75	35/67	66/78	43/64
Sikeres termékenyítések (%)	60,00%	41,33%	52,23%	84,62%	67,19%
Sikeres termékenyítések az állományban (%)	178/289			61,59%	
Kísérleti termékenyítések (%)					
Kos száma	299	4012	4045	4056	4245
Termékenyítések száma (sikeres termékenyítés/ termékenyítések száma összesen)	3/5	17/23	7/14	27/29	43/64
Kísérleti célból végzett sikeres termékenyítések az állományban (%)	60%	73,91%	50%	93,10%	42,85%
kísérletek/kezelések száma	5 ivarzás szinkronizálás	3 ivarzás szinkronizálás 7 szedimentálás 15 elektromágneses kezelés	4 ivarzás szinkronizálás 11 szedimentálás	13 ivarzás szinkronizálás 8 szedimentálás 9 elektromágneses kezelés	nincs ivarzás szinkronizálás 6 szedimentálás 8 elektromágneses kezelés
Az ivarzás szinkronizálás és az egyéb kezelések sok esetben együttesen kerültek alkalmazásra.					
Kísérleti célból végzett sikeres termékenyítések az állományban (%)	61/85			70,58%	

*11. diagram: Termékenyítési eredmények az állományban (%)*



## **4.2. Fázisvizsgálatok eredményei a mélyhűtés során (2008)**

### **4.2.1. Az egyes kosok szaporítóanyagának mélyhűtésre való alkalmasságának vizsgálata**

A 2008-as évben az egyes kosok szaporítóanyagának mélyhűtésre való alkalmasságát vizsgáltam.

Jelen esetben a fluoreszcens festési eljárással történt a mélyhűtésre való előkészítés egyes fázisaiban, illetve a különböző összetételű visszamelegítő oldatokban végzett visszamelegítést követően az ép membránnal rendelkező, kapacitációszerű elváltozáson, illetve akroszóma-reakción átesett spermiumsejtek arányának meghatározása.

#### **4.2.1.1. Kos- és baksperma kapacitációszerű membránváltozásainak és akroszóma-reakciójának vizsgálata fluoreszcens festési eljárással**

Vizsgálatok elvégzése során a Pharmagene-Farm Kft, Biotecnikai Állomáson a használatban lévő lacaune tenyészkosok hígított, 2-4°C-on hűtött és mélyhűtött spermáját vizsgáltam fluoreszcens festési eljárással, amely alkalmas kos és bakkecske ejakulátumában kapacitációszerű membránváltozáson és akroszóma reakción átesett spermiumsejtek arányának meghatározására. A vizsgálatok 2007. őszén kezdődtek ekkor került sor a hígított és 2-4 °C-on 1-2 napig tárolt kossperma élősejtszám % vizsgálatára és kapacitációs állapot ellenőrzésére. Pelletben mélyhűtött kos- és baksperma vizsgálata 2008. tavaszán kezdődött el. A különböző kosoktól származó

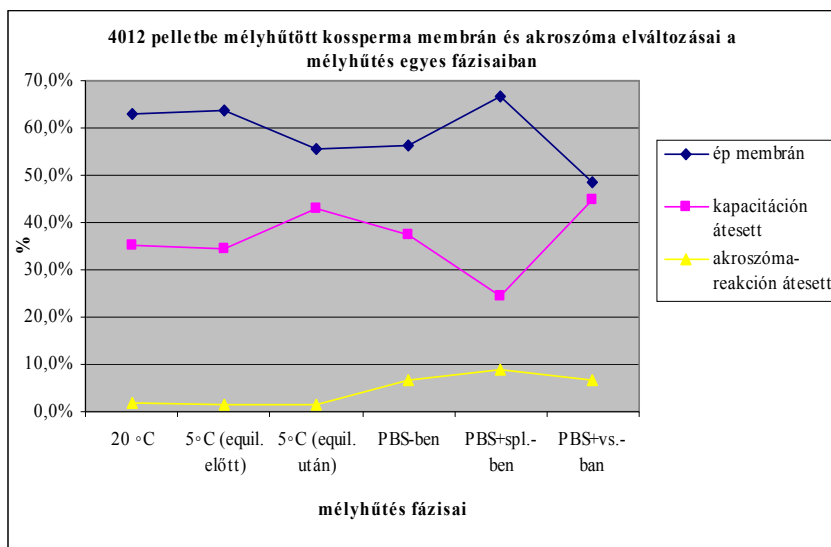
szaporítóanyag minták mélyhűtésre előkészítés (előhűtés, hígítás, egyensúlyozás), majd a mélyhűtés egyes fázisaiban (szárzájégen folyékony és nitrogénben), végül a különböző összetételű oldatokban történő visszaolvasztás során kerültek vizsgálatra. A vizsgált paraméterek élősejtszám %, membrán- és akroszóma állapota. Így kiderül, hogy mely lépéseknél következik be a legnagyobb mértékű elhalás, károsodás. Már a vizsgálat kezdete előtt folyamatosan vett sperma minőségét is folyamatosan ellenőriztem. Minden levett mintából fénymikroszkóp alatt élősejtszám vizsgálatot végeztem. A spermavétel után közvetlenül a fénymikroszkópos vizsgálatot is megtörtént, amellyel meghatározásra került a frissen vett sperma sűrűsége, tömegmozgása, majd hígítás után az élősejtszáma. A granulált kos- és baksperma élősejtszámát visszaolvasztás után is vizsgáltam. A visszaolvasztás PBS (foszfát puffer) oldatban, illetve spermaplazmával és vérsavóval adalékolt dekapacitáló faktorokat tartalmazó foszfátpuffer oldatokban (PBS) történt. A dekapacitációhoz spermaplazmát és vérplazmát használtunk. Pozitív hatását már visszaolvasztás után az élősejtszám vizsgálatánál tapasztaltuk. A dekapacitáló faktort tartalmazó oldatokban több volt az élő-jól mozgó sejtek száma, mint a faktorokat nem tartalmazó PBS oldatban. A fluoreszcens vizsgálat eredményeinek értékelésekor is számos esetben jobb eredményeket kaptunk a dekapacitáló faktort tartalmazó PBS oldatban visszaolvasztott minták esetében. Mivel a membrán és kapacitációszerű változások is jelentősen befolyásolják a spermiumok termékenyítő képességét, tehát az élő és jól mozgó sejtek aránya mellett a kapacitációszerű elváltozáson és akroszóma-reakción átesett

spermiumok aránya egyaránt befolyásolja a termékenyítő képességet. A vizsgálatok 2008. őszén természetesen tovább folytatódtak.

25. táblázat: 4012-es kos sejtmembrán- és akroszóma vizsgálata az előkészítés és a mélyhűtés egyes fázisaiban  
n (mintaszám tenyészkosonként)=4

4012			
mélyhűtés fázisai	ép membrán	kapacitáción átesett	akroszóma-reakción átesett
20 °C	62,80%	35,20%	2,00%
5°C (equil. előtt)	63,80%	34,50%	1,30%
5°C (equil. után)	55,70%	42,80%	1,50%
PBS-ben	56,20%	37,30%	6,50%
PBS+spl.-ben	66,50%	24,50%	9,00%
PBS+vs.-ban	48,50%	45,00%	6,50%

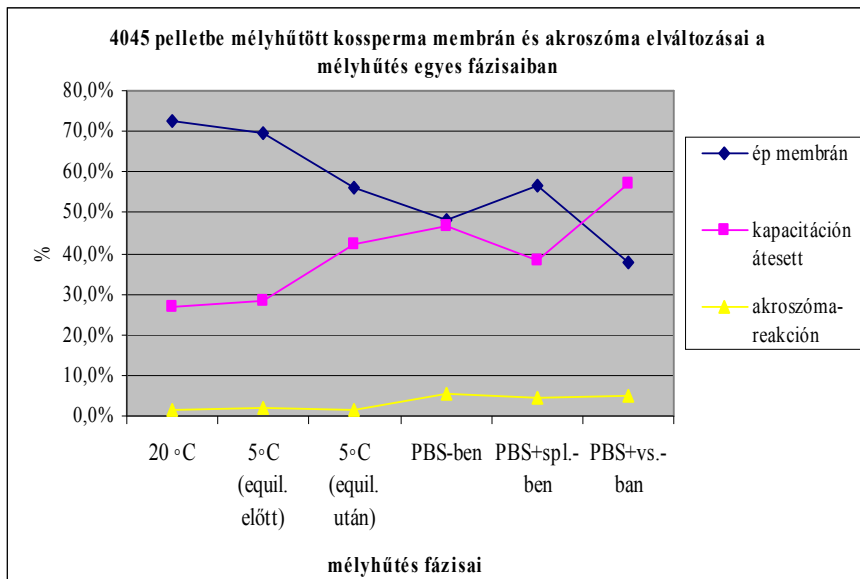
12. diagram: 4012-es kos sejtmembrán- és akroszóma vizsgálata az előkészítés és a mélyhűtés egyes fázisaiban  
n (mintaszám tenyészkosonként)=4



26. táblázat: 4045-ös kos sejtmembrán- és akroszóma vizsgálata az előkészítés és a mélyhűtés egyes fázisaiban  
n (mintaszám tenyészkosonként)=3

4045			
mélyhűtés fázisai	ép membrán	kapacitáción átesett	akroszóma-reakción átesett
20 °C	72,30%	26,60%	1,30%
5°C (equil. előtt)	69,70%	28,30%	2,00%
5°C (equil. után)	56,30%	42,00%	1,50%
PBS-ben	48,00%	46,50%	5,50%
PBS+spl.-ben	56,80%	38,50%	4,70%
PBS+vs.-ban	38,00%	57,20%	4,80%

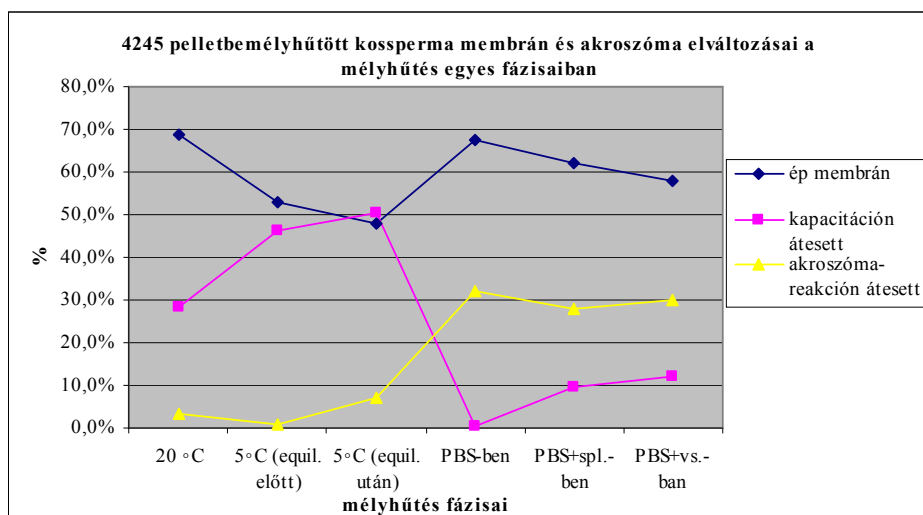
13. diagram: 4045-ös kos sejtmembrán- és akroszóma vizsgálata az előkészítés és a mélyhűtés egyes fázisaiban  
n (mintaszám tenyészkosonként)=3



27. táblázat: 4245-ös kos sejtmembrán- és akroszóma vizsgálata az előkészítés és a mélyhűtés egyes fázisaiban  
*n* (mintaszám tenyészkosonként)=1

4245			
mélyhűtés fázisai	ép membrán	kapacitáción átesett	akroszóma-reakción átesett
20 °C	68,80%	28,50%	3,30%
5°C (equil. előtt)	52,80%	46,30%	1,00%
5°C (equil. után)	47,80%	50,30%	7,00%
PBS-ben	67,50%	0,50%	32,00%
PBS+spl.-ben	62,00%	9,50%	28,00%
PBS+vs.-ban	58,00%	12,00%	30,00%

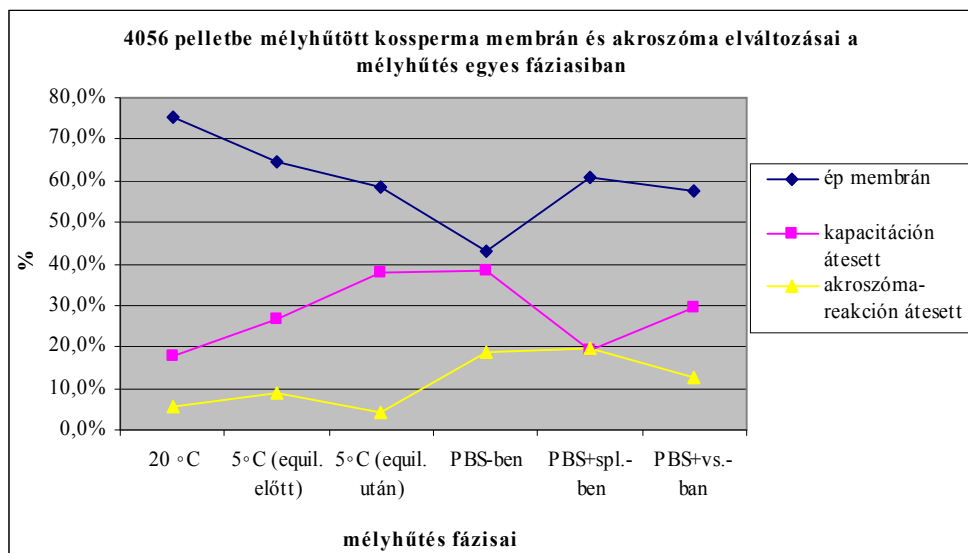
14. diagram: 4245-ös kos sejtmembrán- és akroszóma vizsgálata az előkészítés és a mélyhűtés egyes fázisaiban  
*n* (mintaszám tenyészkosonként)=1



28. táblázat: 4056-os kos sejtmembrán- és akroszóma vizsgálata az előkészítés és a mélyhűtés egyes fázisaiban  
n (mintaszám tenyészkosonként)=3

4056			
mélyhűtés fázisai	ép membrán	kapacitáción átesett	akroszóma-reakción átesett
20 °C	75,50%	17,80%	5,80%
5°C (equil. előtt)	64,60%	26,60%	9,00%
5°C (equil. után)	58,30%	37,70%	4,00%
PBS-ben	43,20%	38,30%	18,50%
PBS+spl.-ben	61,00%	19,20%	19,70%
PBS+vs.-ban	57,70%	29,70%	12,70%

15. diagram: 4056-os kos sejtmembrán- és akroszóma vizsgálata az előkészítés és a mélyhűtés egyes fázisaiban  
n (mintaszám tenyészkosonként)=3



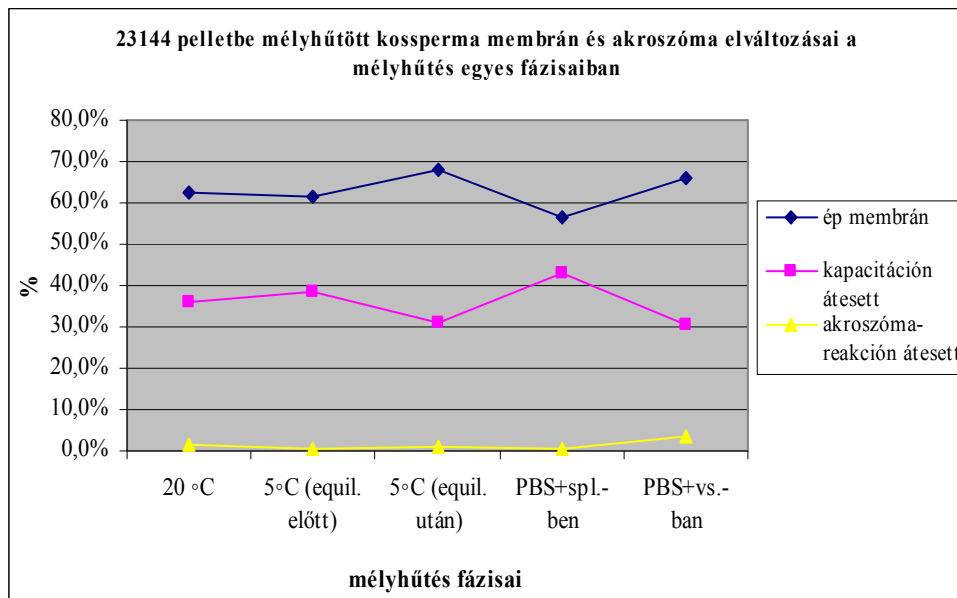
29. táblázat: 23144-es kos sejtmembrán- és akroszóma vizsgálata az előkészítés és a mélyhűtés egyes fázisaiban

$n$  (mintaszám tenyészkosonként)=1

23144			
vizsgálat időpontja	ép membrán	kapacitáción átesett	akroszóma-reakción átesett
20 °C	62,50%	36,00%	1,50%
5°C (equil. előtt)	61,50%	38,50%	0,50%
5°C (equil. után)	68,00%	31,00%	1,00%
PBS-ben	N.a.	N.a.	N.a.
PBS+spl.-ben	56,50%	43,00%	0,50%
PBS+vs.-ban	66,00%	30,50%	3,50%

16. diagram: 23144-es kos sejtmembrán- és akroszóma vizsgálata az előkészítés és a mélyhűtés egyes fázisaiban

$n$  (mintaszám tenyészkosonként)=1

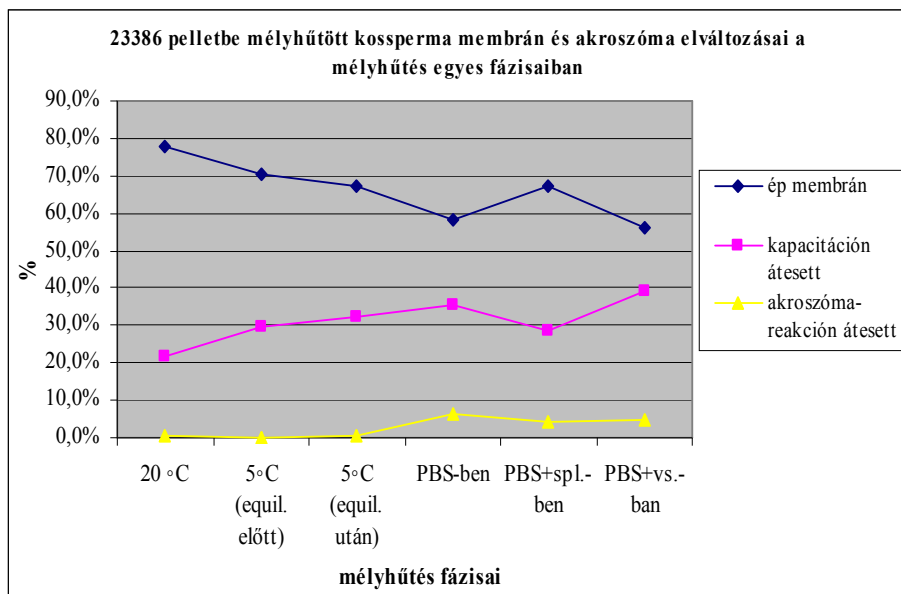




30. táblázat: 23386-os kos sejtmembrán- és akroszóma vizsgálata az előkészítés és a mélyhűtés egyes fázisaiban  
n (mintaszám tenyészkosonként)=1

23386			
mélyhűtés fázisai	ép membrán	kapacitáción átesett	akroszóma-reakción átesett
20 °C	78,00%	21,50%	0,50%
5°C (equil. előtt)	70,50%	29,50%	0,00%
5°C (equil. után)	67,00%	32,50%	0,50%
PBS-ben	58,00%	35,50%	6,50%
PBS+spl.-ben	67,50%	28,50%	4,00%
PBS+vs.-ban	56,00%	39,00%	5,00%

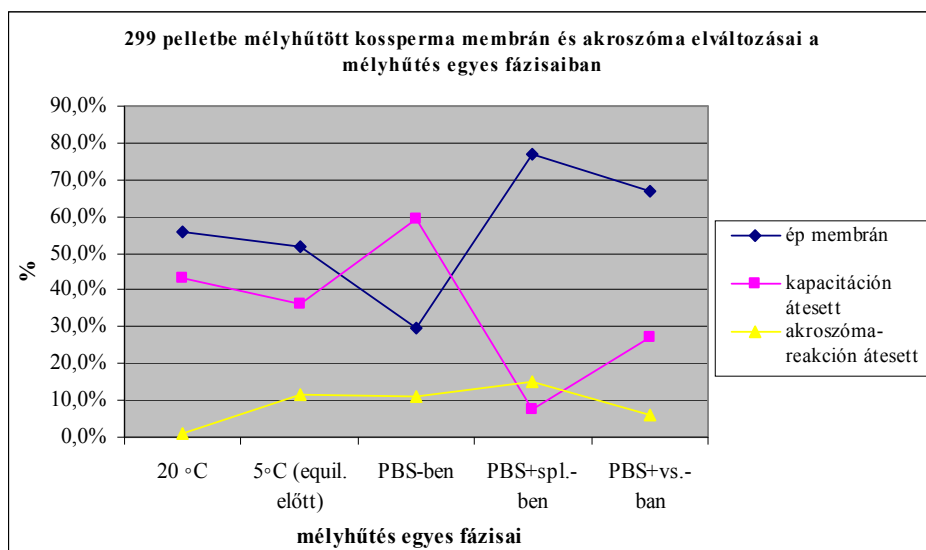
17. diagram: 23386-os kos sejtmembrán- és akroszóma vizsgálata az előkészítés és a mélyhűtés egyes fázisaiban  
n (mintaszám tenyészkosonként)=1



31. táblázat: 299-es kos sejtmembrán- és akroszóma vizsgálata az előkészítés és a mélyhűtés egyes fázisaiban  
n (mintaszám tenyészkosonként)=1

299			
mélyhűtés fázisai	ép membrán	kapacitáción átesett	akroszóma-reakción átesett
20 °C	56,00%	43,00%	1,00%
5°C (equil. előtt)	52,00%	36,00%	11,50%
5°C (equil. után)	N.a.	N. a.	N.a.
PBS-ben	29,50%	59,50%	11,00%
PBS+spl.-ben	77,00%	7,50%	15,00%
PBS+vs.-ban	67,00%	27,00%	6,00%

18. diagram: 299-es kos sejtmembrán- és akroszóma vizsgálata az előkészítés és a mélyhűtés egyes fázisaiban  
n (mintaszám tenyészkosonként)=1



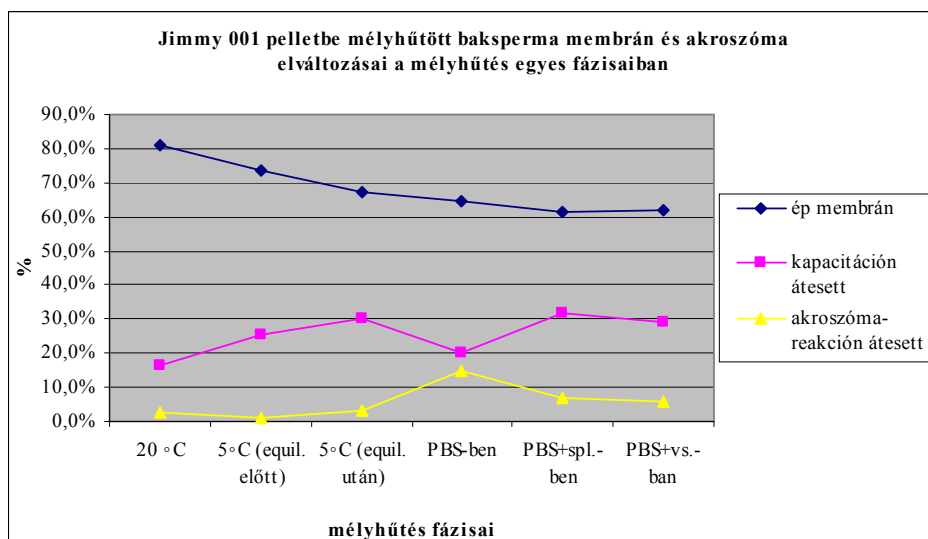
32. táblázat: Jimmy 001-es bakkecske sejtmembrán- és akroszóma vizsgálata az előkészítés és a mélyhűtés egyes fázisaiban

*n* (mintaszám tenyészbakonként)=1

Jimmy 001			
mélyhűtés fázisai	ép membrán	kapacitáción átesett	akroszóma-reakción átesett
20 °C	81,00%	16,30%	2,70%
5°C (equil. előtt)	73,80%	25,20%	1,30%
5°C (equil. után)	67,10%	30,00%	3,10%
PBS-ben	64,80%	20,30%	14,80%
PBS+spl.-ben	61,50%	31,50%	7,00%
PBS+vs.-ban	62,20%	29,30%	6,00%

19. diagram: Jimmy 001-es bakkecske sejtmembrán- és akroszóma vizsgálata az előkészítés és a mélyhűtés egyes fázisaiban

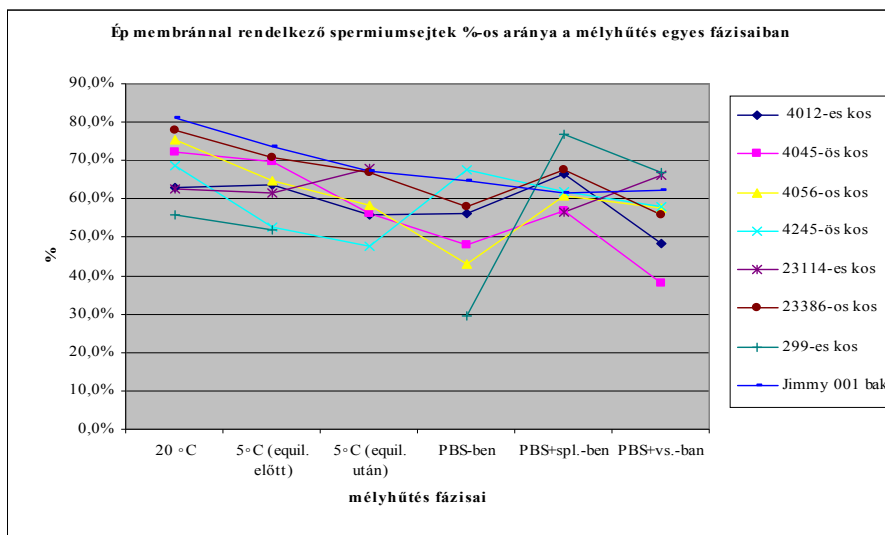
*n* (mintaszám tenyészbakonként)=1



33. táblázat: Ép membránnal rendelkező spermiumsejtek aránya az egyes fázisokban átlageredmények alapján

Ép membránnal rendelkező spermiumsejtek aránya (%) az egyes fázisokban								
mélyhűtés fázisai	4012	4045	4056	4245	23144	23386	299	Jimmy 001
20 °C	62,80%	72,30%	75,50%	68,80%	62,50%	78,00%	56,00%	81,00%
5°C (equil. előtt)	63,80%	69,70%	64,60%	52,80%	61,50%	70,50%	52,00%	73,80%
5°C (equil. után)	55,70%	56,30%	58,30%	47,80%	68,00%	67,00%	N. a.	67,10%
PBS-ben	56,20%	48,00%	43,20%	67,50%	N. a.	58,00%	29,50%	64,80%
PBS+spl.-ben	66,50%	56,80%	61,00%	62,00%	56,50%	67,50%	77,00%	61,50%
PBS+vs.-ban	48,50%	38,00%	57,70%	58,00%	66,00%	56,00%	67,00%	62,20%

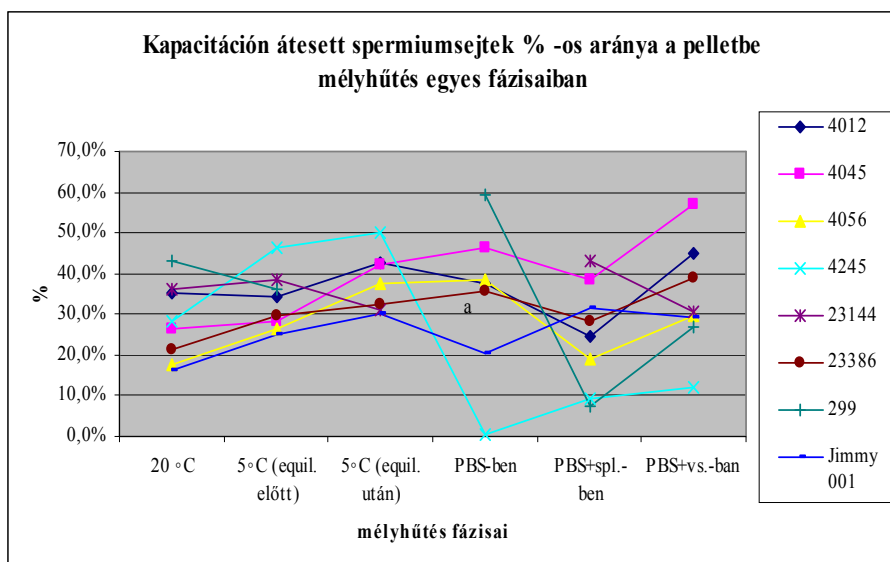
20. diagram: Ép membránnal rendelkező spermiumsejtek aránya az egyes fázisokban átlageredmények alapján



34. táblázat: Kapacitáción átesett spermiumsejtek aránya az egyes fázisokban átlageredmények alapján

Kapacitáción átesett spermiumsejtek aránya (%) az egyes fázisokban								
mélyhűtés fázisai	4012	4045	4056	4245	23144	23386	299	Jimmy 001
20 °C	35,20%	26,60%	17,80%	28,50%	36,00%	21,50%	43,00%	16,30%
5°C (equil. előtt)	34,50%	28,30%	26,60%	46,30%	38,50%	29,50%	36,00%	25,20%
5°C (equil. után)	42,80%	42,00%	37,70%	50,30%	31,00%	32,50%	N.a.	30,00%
PBS-ben	37,30%	46,50%	38,30%	0,50%	N.a.	35,50%	59,50%	20,30%
PBS+spl.-ben	24,50%	38,50%	19,20%	9,50%	43,00%	28,50%	7,50%	31,50%
PBS+vs.-ban	45,00%	57,20%	29,70%	12,00%	30,50%	39,00%	27,00%	29,30%

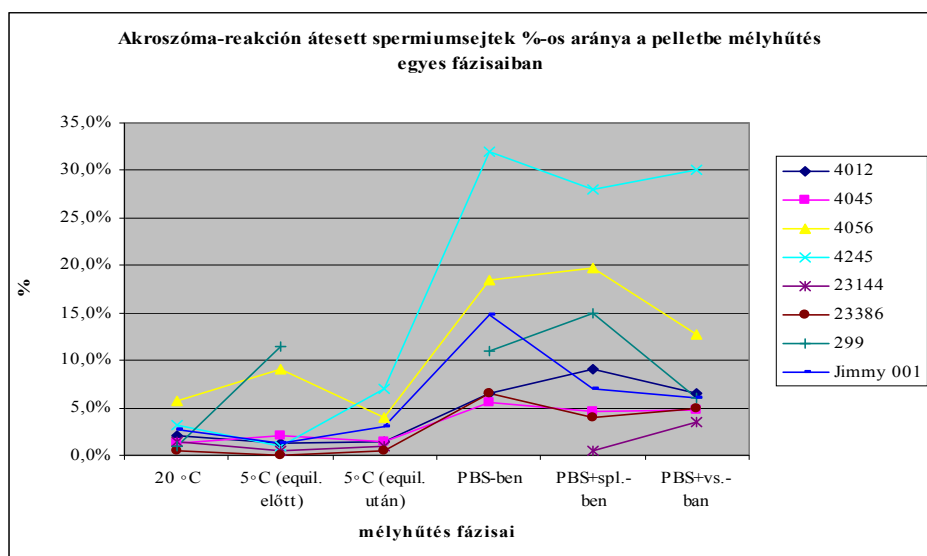
21. diagram: Kapacitáción átesett spermiumsejtek aránya az egyes fázisokban átlageredmények alapján



35. táblázat: Akroszóma-reakción átesett spermiumsejtek aránya a mélyhűtés-, előkészítés egyes fázisaiban átlageredmények alapján

Akroszóma-reakción átesett spermiumsejtek aránya (%) az egyes fázisokban								
mélyhűtés fázisai	4012	4045	4056	4245	23144	23386	299	Jimmy 001
20 °C	2,00%	1,30%	5,80%	3,30%	1,50%	0,50%	1,00%	2,70%
5°C (equil. előtt)	1,30%	2,00%	9,00%	1,00%	0,50%	0,00%	11,50%	1,30%
5°C (equil. után)	1,50%	1,50%	4,00%	7,00%	1,00%	0,50%	N.a.	3,10%
PBS-ben	6,50%	5,50%	18,50%	32,00%	N.a.	6,50%	11,00%	14,80%
PBS+spl.-ben	9,00%	4,70%	19,70%	28,00%	0,50%	4,00%	15,00%	7,00%
PBS+vs.-ban	6,50%	4,80%	12,70%	30,00%	3,50%	5,00%	6,00%	6,00%

22. diagram: Akroszóma-reakción átesett spermiumsejtek aránya a mélyhűtés-, előkészítés egyes fázisaiban átlageredmények alapján



Az eredmények értékelésénél az élősejtszám %-ot, amely alatt az élő és jól mozgó sejtek arányát értjük és a membrán, valamint az akroszóma állapotát egyaránt figyelembe vettük az értékelésnél, hiszen mindegyik tulajdonság nagymértékben hozzájárul a termékenyítőképességhez.

Az eredményekből látszik, hogy az általunk Jimmy 001-nek nevezett bakkecske spermája bírta legjobban a mélyhűtést, itt átlagban 64,8-61,15 % között volt az ép membránnal rendelkező sejtek aránya. Igaz a mélyhűtés előtt 81%-ról indult.

Az ép sejtmembrán tekintetében jól bírta még a mélyhűtést a 4245, a 23386, a 4012. A 4056-os és 23144-es is jól reagált a dekapacitáló faktorokra.

Élősejtszám % tekintetében a visszaolvasás után kiemelkedő eredményt ért el a 4056-os számú kos, amely dekapacitáló faktor hozzáadásával 35-40%, sőt esetenként 40-45%-os élősejtszámot is elérte, ami mélyhűtött kossperma esetében jónak mondható eredmény. Ez a termékenyítőanyag már biztonságosan felhasználható.

A mélyhűtött baksperma esetében az élősejtszám 35-50 % körüli volt. A 4045 ahol a visszaolvasztás utáni élősejtszámot vizsgálva 45-40 %, sőt egy esetben 60 % –os eredményt is elértünk.

Az „Ép membránnal rendelkező spermiumsejtek %-os aránya a mélyhűtés egyes fázisaiban” és a „Kapacitáción átesett spermiumsejtek %-os aránya a pelletbe mélyhűtés egyes fázisaiban”

– című diagramokról egyértelműen látszik, hogy a mélyhűtés utáni visszamelegítést követően az egyes kosok és a bak spermájára milyen hatással voltak a PBS oldathoz adott dekapacitáló faktorok. (spermaplazma, vérplazma)

A következő táblázatban az egyes kosoktól és baktól származó PBS-ben és az ahhoz hozzáadott dekapacitáló faktorokat tartalmazó oldatokban történő visszaolvasztás után az ép membránnal rendelkező, illetve kapacitáción átesett spermiumok arányát ábrázoltam. Mindezek alapján rangsoroltam a kosok és a bak spermájának mélyhűtésre való alkalmasságát és azt, hogy hogyan reagálnak a dekapacitáló faktorokra.



36. táblázat: Ép membránnal rendelkező és kapacitált spermiumok aránya a dekapacitáló faktorokkal és anélkül atlageredmények alapján

Ép membránnal rendelkező spermiumsejtek aránya				Kapacitáción átesett spermiumsejtek aránya (%)		
visszaolvasztó oldat	sorrend	Kos-/bak	Eredmény (%)	sorrend	Kos-/bak ENAR száma	Eredmény (%)
		ENAR száma				
PBS	1.	4245	67,5	1.	4245	0,5
	2.	Jimmy 001	64,8	2.	Jimmy 001	20,3
	3.	23386	58,0	3.	23386	35,5
	4.	4012	56,2	4.	4012	37,3
	5.	4045	48,0	5.	4056	38,3
	6.	4056	43,2	6.	4045	46,5
	7.	299	29,5	7.	299	59,5
	8.	23144	N.a.	8.	23144	N.a.
PBS+ spermaplazma	1.	299	77,0	1.	299	7,5
	2.	23386	67,5	2.	4245	9,5
	3.	4012	66,5	3.	4056	19,2
	4.	4245	62,0	4.	4012	24,5
	5.	Jimmy 001	61,5	5.	23386	28,5
	6.	4056	61,0	6.	Jimmy 001	31,5
	7.	4045	56,8	7.	4045	38,5
	8.	23144	56,5	8.	23144	43,0
PBS + vérsavó	1.	299	67,0	1.	4245	12,0
	2.	23144	66,0	2.	299	27,0
	3.	Jimmy 001	62,2	3.	Jimmy 001	29,3
	4.	4245	58,0	4.	4056	29,7
	5.	4056	57,7	5.	23144	30,5
	6.	23386	56,0	6.	23386	39,0
	7.	4012	48,5	7.	4012	45,0
	8.	4045	38,0	8.	4045	57,2

A visszamelegítés során a legjobb eredményt a 299-es ENAR számú kos spermája érte el. Mindkét dekapacitáló faktorra az összes közül a legjobban reagált.

PBS-ben visszaolvasztva az ép membránnal rendelkezők közül az utolsó helyre került 29,5%-os eredménnyel, de a dekapacitáló faktorok segítségével 77%, illetve 66%-os az ép membránnal rendelkezők aránya.

A spermaplazma, mint dekapacitáló faktort tartalmazó komponensre a 299, 4012, 4056, 4045 és 23386-os kosok reagáltak jobban, bár meg kell jegyezni, hogy a 23386-os kos mintáiban az ép membránnal rendelkező spermiumsejtek aránya a PBS-hez hozzáadott vérsavót tartalmazó visszamelegítő oldatok esetében végzett visszamelegítést követően sem maradt el sokkal, csupán 1,5%-al a PBS+spermaplazmában történő visszamelegítés eredményeitől.

A vérsavóval, mint dekapacitáló faktort tartalmazó PBS-ben történő visszamelegítés után az előbb említett 23386-os és 23144-es állatok hígított spermája ért el jobb eredményt. 23144-es volt az egyetlen, amely a vérsavóra jobban reagált, bár a PBS-ben történő visszamelegítésre vonatkozó eredményünk nincs, így tehát nem tudjuk egyértelműen kijelenteni, hogy jobb, vagy rosszabb lett annál.

Jimmy 001-es számú bakkecskétől vett mélyhűtés után visszamelegített szaporítóanyag rosszul reagált mindkét dekapacitáló faktorra, ugyanis ez esetben a dekapacitáló faktort tartalmazó komponensek jelenléte a visszamelegítő oldatban ugyan kis mértékben, de csökkentette az ép membránnal rendelkezők arányát. Jelen esetben ez érthető is, mivel itt egy másik állatfaj a juh spermaplazmáját és vérsavóját adtuk a PBS oldathoz. Bizonyára jobb eredményeket kaptunk volna, ha a bakkecskéjét használjuk. Az mindenesetre megállapítható, hogy még ennek ellenére is viszonylag sok az ép membránnal rendelkezők aránya a PBS-ben visszamelegítettnél a 2. legjobb, de a „vérplazmával dúsított” oldatban is a 3. és még a spermaplazmával „dúsítottnál” is az 5. helyen áll a 8

közül. Igaz, hogy a 20°C-os fázisban az ép membránnal rendelkezők aránya Jimmy 001 esetében volt a legmagasabb, szám szerint 81%.

A kapacitáción átesett spermiumok arányával kapcsolatban érdemes megjegyezni, hogy a dekapacitáló faktorokat tartalmazó komponensek különösen a spermaplazma estében az egyes kosoktól és tenyészbaktól származó mélyhűtés után visszaolvasztott mintákon a kapacitáción átesett spermiumsejtek aránya legalább olyan mértékben csökken, mint amilyen mértékben az ép membránnal rendelkező spermiumsejtek aránya növekszik. Ebből látszik, hogy a dekapacitáló faktorok ténylegesen kifejtik hatásukat. A következő kosok mélyhűtés után visszamelegített szaporító anyaga esetében ez különösen jól látható a diagramokon: 4012, 4045, 4056, 23386, 299-es ENAR számú állatok esetében a spermaplazma dekapacitáló faktorai fejtették ki látványosan hatásukat, 23144-es kosnál pedig a vérsavó dekapacitáló faktorának pozitív hatása figyelhető meg a diagramon.

Az akroszóma-reakción átesett spermiumsejtek aránya minden esetben látványosan megemelkedett a mélyhűtés utáni visszamelegítést követően.

#### **4.2.1.2. Fénymikroszkópos vizsgálatok**

A fénymikroszkópos vizsgálatok esetén a hígított és mélyhűtés után visszamelegített kossperma élő és jól mozgó sejtjeinek százalékos aránya alapján szintén tudunk következtetni a termékenyítő képességre.

Az egyes ejakulátumok termékenyítőképségének meghatározása során először a fénymikroszkópos vizsgálatok során értékeljük az élő és jól mozgó sejtek arányát, majd ezen eredményeket fluoreszcens festés segítségével végzett ép membránnal rendelkező, kapacitáción- és akroszóma-reakción átesett spermiumok arányát határozzuk meg. A két vizsgálati módszer együtt alkalmazása segítséget nyújthat a mélyhűtött kos- és baksperma termékenyítésre való alkalmasságának ellenőrzésében és megfelelő minőségének biztosításában, mielőtt a mélyhűtött kos- és baksperma értékesítésre kerül.

Megfelelő visszaigazolást azonban csak a termékenyítési eredmények, az előzetes ellenőrzésre szolgáló ún. non-return index és az a végleges értékelés alapjául szolgáló ellési % adhat majd.

A fénymikroszkópos vizsgálatok adatainak elemzése előtt az is megjegyzendő, hogy a kapacitáción átesett kos- és bak ejakulátumaiban jelenlévő spermiumsejtek mozgása élénk, tehát a mikroszkóp alatt megfigyelhető magasabb élő- és jól mozgó sejtek arányával valószínűleg a kapacitáción átesett spermiumsejtek aránya is növekszik. Ez kis mértékben torzíthatja az eredményeket.

37. táblázat: Élő- és jól mozgó spermiumsejtek aránya egyes kosok és bakkecske mélyhűtés előtti és visszamelegítés utáni hígított spermájában

kos-/bak ENAR száma	mélyhűtés időpontja 2008.	Hígított		Visszamelegített	
		20°C-on	PBS-ben	PBS+spermaplazmában	PBS+vérsvóban
		Élősejt %	Élősejt. %	Élősejt%	Élősejt %
4012	2008.02.26	70-75	15	25	20
	2008.03.04	70	30	30	30
	2008.03.12	70	25	35-40	40
	2008.03.25	70	25	30	20
4045	2008.02.26	75-80	20	25	25
	2008.03.06	70	30	35-40	25
	2008.03.12	65	60	40	25
4245	2008.02.27	70	20	30	25
4056	2008.02.27	70	25	30	30
	2008.03.04	70	35-40	35	30
	2008.03.20	70-75	35	40-45	40-45
23144	2008.03.19	70	15	25	30-35
23386	2008.03.19	65	15	20	25
299	2008.03.20	65	15	25	20
Jimmy 001	2008.03.11	65	20	45	25

#### 4.3. Évszakhatás vizsgálat

2008 tavaszán és őszén zajlott az évszakhatás vizsgálat. Ezen vizsgálat során meghatározásra került az ejakulátumok mennyisége, élősejtszáma és a mélyhűtés után PBS, illetve különböző dekapacitáló faktorokat tartalmazó oldatokban a visszamelegítést követően a membrán-, illetve akroszóma állapotának vizsgálata is megtörtént.

### 4.3.1. Ejakulátumok mennyiségének változása az évszaktól függően

Az állatok többsége, számszerűsítve a 7-ből 4 állat az őszi időszakban átlagosan nagyobb mennyiségű ejakulátumokat adott.

A vizsgálatok során kapott eredményeket az alábbi táblázat és grafikon szemlélteti

38. táblázat: Évszakonként változó átlagos spermamennyiség (ml)

Minták száma minden vizsgálatba bevont kos esetében:

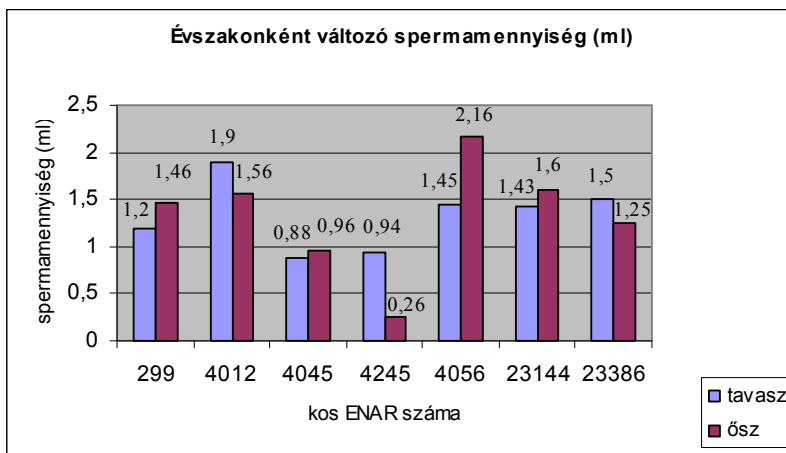
$$n=20; n_{\text{tavasz}}=10; n_{\text{ősz}}=10$$

Évszakonként változó átlagos spermamennyiség (ml)							
	299	4012	4045	4245	4056	23144	23386
tavasz	1,2	1,9	0,88	0,94	1,45	1,43	1,5
ősz	1,46	1,56	0,96	0,26	2,16	1,6	1,25

23. diagram: Évszakonként változó spermamennyiség (ml)

Minták száma minden vizsgálatba bevont kos esetében:

$$n=20; n_{\text{tavasz}}=10; n_{\text{ősz}}=10$$



#### **4.3.2. Évszakonként változó élősejtszám % a különböző dekapacitáló faktorokat tartalmazó oldatokban a mélyhűtést követő visszamelegítés után**

A vizsgálati eredmények alapján megállapítható, hogy a frissen hígított kossperma mintákból 7 állat esetében magasabb élősejtszám volt megfigyelhető.

A mélyhűtés után visszamelegített őszi minták esetében megfigyelhető, hogy a 4-6 éves tenyészerett kosok (299, 4012, 4045, 4056, 4245) mintáinak visszaolvasztásakor a vérplazmával dúsított visszamelegítő oldatban volt magasabb az élősejtszám, míg a 1,5-2 éves még nem tenyészerett csak az ugratásra való szoktatás fázisában lévő kosoknál (23144, 23386) az őszi időszakban minden esetben a spermaplazmával dúsított oldat volt a hatékonyabb.

A tavaszi időszakban az élősejtszám tekintetében egy kos kivételével (23386) a dekapacitáló faktorokat tartalmazó oldatok közül a spermaplazmával dúsított visszamelegítő oldat volt a hatékonyabb.

A mélyhűtés után visszamelegített minták élősejtszámának átlag eredményei alapján megállapíthatjuk, hogy a 4045-ös kos kivételével az összes többi kosnál, valamely ősszel vett ejakulátumból mélyhűtött dekapacitáló faktorról dúsított visszamelegítő oldatban felolvasztott minta volt a legjobb. Tehát élősejtszám szempontjából is az ősszel vett kossperma a mélyhűtésre legalkalmasabb. A dekapacitáló faktorokat tartalmazó vérsavó és spermaplazma adalékanyagként történő használata a visszamelegítő oldatokban mindenképpen indokolt.

39. táblázat: Évszakonként változó élősejtszám% a friss hígított ejakulátumokban és a mélyhűtés utáni visszamelegítést követően a különböző oldatokban (%)

Minták száma minden vizsgálatba bevont kos esetében:

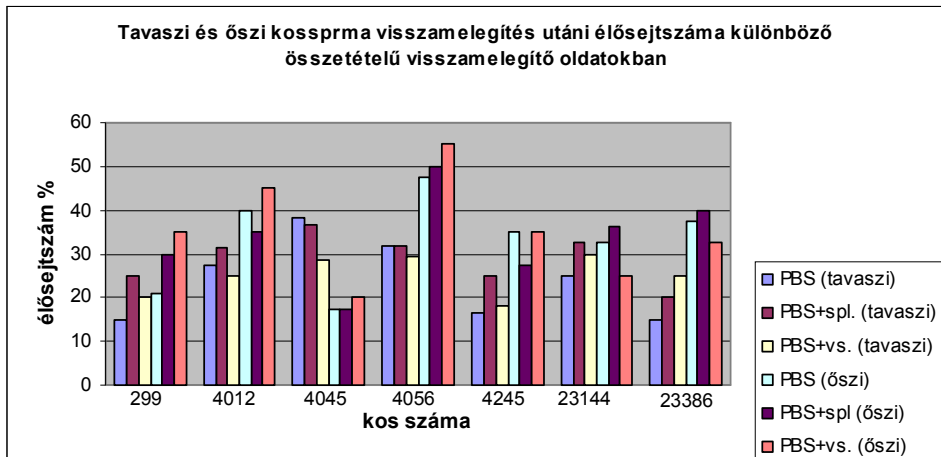
$$n=20; n_{\text{tavasz}}=10; n_{\text{ősz}}=10$$

Évszakonként és mélyhűtési fázisonként változó élősejtszám (%)								
Évszak	Fázis	299	4012	4045	4056	4245	23144	23386
tavasz	testhőm.	65	69,5	71,8	70,4	67	70	65
	PBS	15	27,5	38,1	32	16,7	25	15
	PBS+spl	25	31,5	36,8	31,9	25	32,5	20
	PBS+vs	20	25	28,8	29,4	18,3	30	25
ősz	testhőm.	75	70	67,5	67,5	70	72,5	70
	PBS	20,8	40	17,5	47,5	35	32,5	37,5
	PBS+spl	30	35	17,5	50	27,5	36,25	40
	PBS+vs	35	45	20	55	35	25	32,5

24. diagram: Tavaszi és őszi kossperma visszamelegítés utáni élősejtszám különböző összetételű visszamelegítő oldatokban

Minták száma minden vizsgálatba bevont kos esetében:

$$n=20; n_{\text{tavasz}}=10; n_{\text{ősz}}=10$$



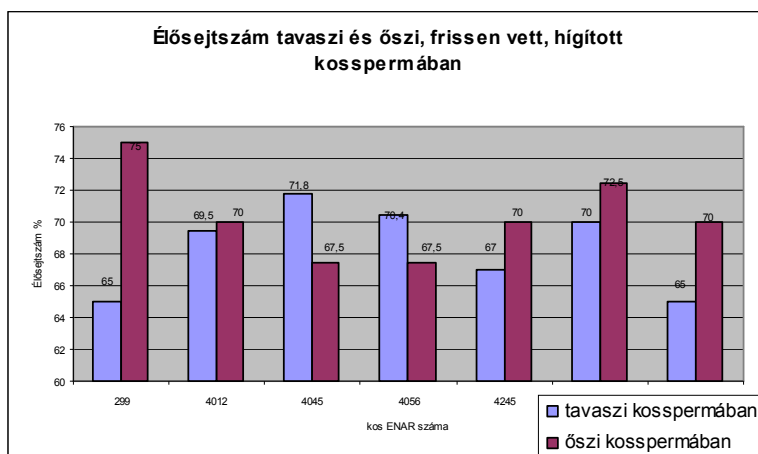


25. diagram: Élősejtszám % tavaszi és őszi frissen vett hígított kosspermában

Minták száma minden vizsgálatba bevont kos esetében:

$$n=20; n_{\text{tavasz}}=10; n_{\text{ősz}}=10$$

Bevont kosok száma: 7



40. táblázat: Évszakonként és fázisonként változó élősejtszám % (átlagértékek) 2008. ősz, 2008. tavasz

Minták száma minden vizsgálatba bevont kos esetében:

$$n=10; n_{\text{tavasz}}=5; n_{\text{ősz}}=5$$

Bevont kosok száma: 7

Fázis	2008. tavaszi sperma			2008. őszi sperma		
	Ép spermium %	Kapacitációszerű változást mutat %	Akroszóma-reakción átesett %	Ép spermium %	Kapacitációszerű változást mutat %	akroszóma-reakción átesett %
20°C	67,9	29,8	2,2	86,17	2,3	10,5
5°C	61,9	33,89	4,1	70,55	4,3	12,66
equil után	57,5	40,05	3,2	77,29	8,9	13,93
PBS	50,4	36,26	13,33	68,58	8,5	22,25
PBS+spl.	59,69	28,17	11,49	70	8,75	21,25
PBS+vs.	51,89	36,77	11,36	71,78	9,21	18,92

### **4.3.3. CTC fluoreszcens festési eljárással végzett évszakhatás vizsgálatok eredményei**

#### **4.3.3.1. Ép membránnal rendelkezők aránya**

A grafikonokat nézve az ép membránnal rendelkezők aránya az őszi spermában jobb ezt alátámasztják a visszaolvasztás adatai is. A 7 kosból 6 eredményei megerősítik, hogy az egyébként is jobb minőségű kossperma mélyhűthetősége is jobb. Egyedül a 4056-os kos spermája mutat ellenkező eredményt. Az is csak inkább a mélyhűtésre való alkalmasságban, hiszen a hígított és az 5°C-ra hűtött sperma minősége jobb volt, mint a tavaszi, de a visszaolvasztásnál a dekapacitáló faktorokat tartalmazó oldatokban az őszi rosszabb eredményeket mutatott az ép membránnal rendelkező spermiumok arányában.

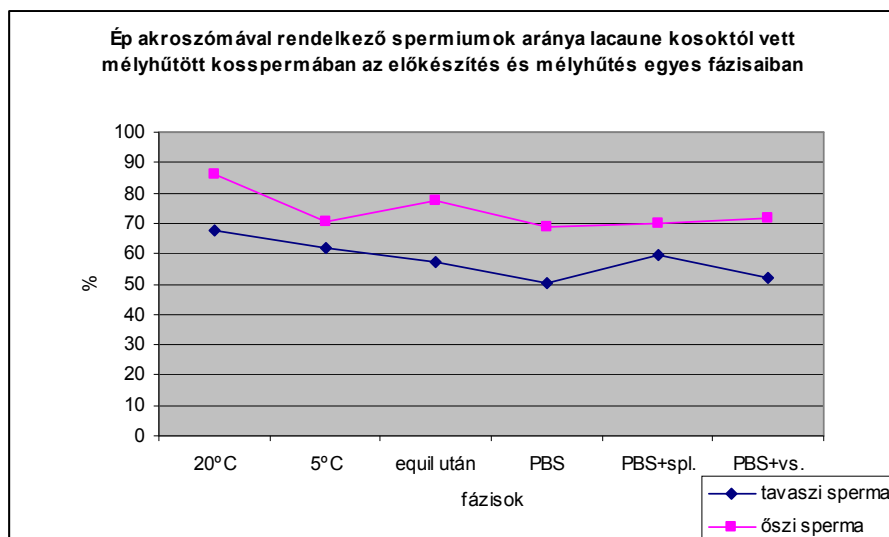
Az alábbi grafikonon látható átlegeredmények jól mutatják az őszi kossperma egyértelműen jobb minőségét és mélyhűtésre való alkalmasságát.

26. diagram: Ép akroszómával rendelkező spermiumok aránya lacaune kosoktól vett mélyhűtött kosspermában az előkészítés és mélyhűtés egyes fázisaiban

Minták száma minden vizsgálatba bevont kos esetében:

$$n=10; n_{\text{tavasz}}=5; n_{\text{ősz}}=5$$

Bevont kosok száma: 7



#### 4.3.3.2. Kapacitációszerű változáson átesett spermiumok aránya

A tavaszi kosspermában egyértelműen több volt a kapacitációszerű elváltozáson átesettek aránya. (A vizsgált 7 kosból 5 esetében ez biztosan állítható.) A 4056-os kos esetében azonban megint az bizonyosodott be, hogy a jobb kiindulási anyagból készített pelleték visszamelegítést követően a dekapacitáló faktorokat tartalmazó PBS oldatban rosszabb eredményeket mutatott. Ebből levonható a

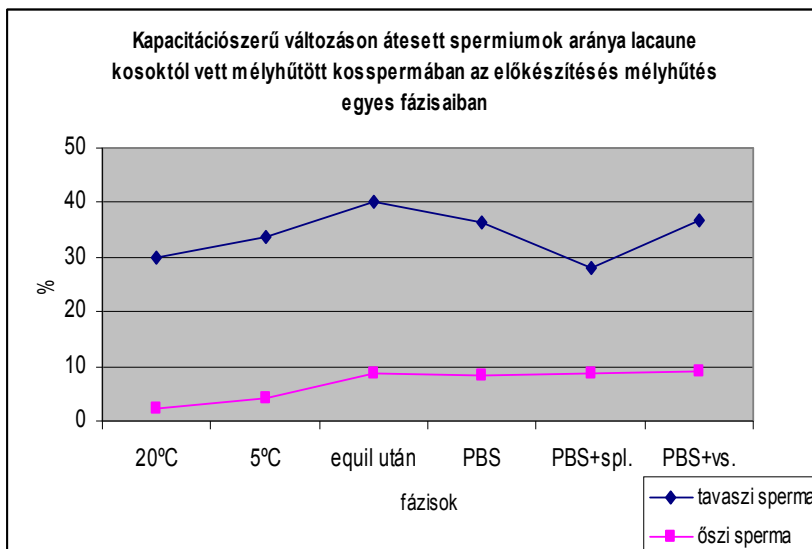
következtetés, hogy a 4056-os mintájának esetében nem voltak hatásosak a dekapacitáló faktorok. A másik kos, amely kevésbé alkalmasnak bizonyult a mélyhűtésre a 4245-ös, hiszen itt is a jobb kiindulási anyagból a visszaolvasztott pelletékből 2 rosszabb eredményt mutatott, még hozzá a PBS oldatban és az ezen kívül még spermaplazmát is tartalmazó oldatban.

Az alábbi grafikonon a kosok mintáinak átlageredményei alapján készült.

27. diagram: *Kapacitációszerű elváltozáson átesett spermiumok aránya lacaune kosoktól vett mélyhűtött kosspermában az előkészítés mélyhűtés egyes fázisaiban*

*Minták száma minden vizsgálatba bevont kos esetében:*

*$n=10$ ;  $n_{tavasz}=5$ ;  $n_{ősz}=5$  Bevont kosok száma: 7*



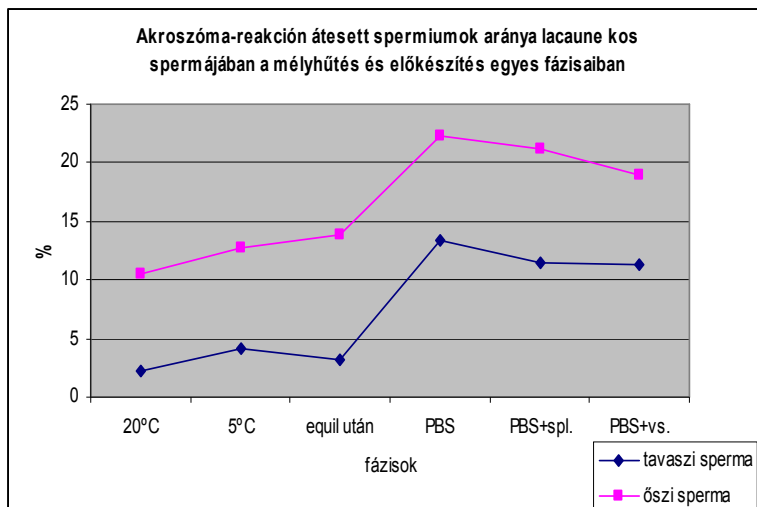
#### 4.3.3.3. Akroszóma-reakción átesett spermiumsejtek aránya

Az eddigi eredményekkel ellentétben a pelletben mélyhűtött, majd ezt követően visszamelegített minták esetén a 7 mintából 6 esetében a tavaszi bizonyult jobbnak, a vizsgálatok szerint ez tartalmazott ugyanis kevesebb akroszóma-reakción átesett sejtet. Az összes közül a 4245-ös kos pelletben mélyhűtött mintája volt a kivétel, mivel a visszamelegített minták közül ez tartalmazott a legkevesebb akroszóma reakción átesett sejtet. Ezen kívül a 4056-os volt még ahol a PBS + spermaplazmában visszamelegített esetén az őszi jobbnak bizonyult. Az alábbi grafikon összesített átlegeredményeket mutat.

29. diagram: Akroszóma-reakción átesett spermiumok aránya lacaune kos spermájában a mélyhűtés és előkészítés egyes fázisaiban

Minták száma minden vizsgálatba bevont kos esetében:

$n=10$ ;  $n_{\text{tavasz}}=5$ ;  $n_{\text{ősz}}=5$  Bevont kosok száma:7



#### 4.4. 2009-es évben végzett vizsgálatok eredményei

##### 4.4.1. Kossperma mennyisége

Már a 2007-2008-ban végzett vizsgálatok eredményei alapján is megállapítható volt, hogy a tenyészkosoktól a főszezon, azaz őszi folyamán vett minták mennyisége több a tavasziénál.

Az alábbi táblázatban és grafikonon szereplő eredmények alapján megállapítható, hogy nem volt ez másként a 2009-es őszi és tavaszi minták esetében sem.

*41. táblázat: Kossperma mennyisége 2009 (ml)*

*Minták száma minden vizsgálatba bevont kos esetében:*

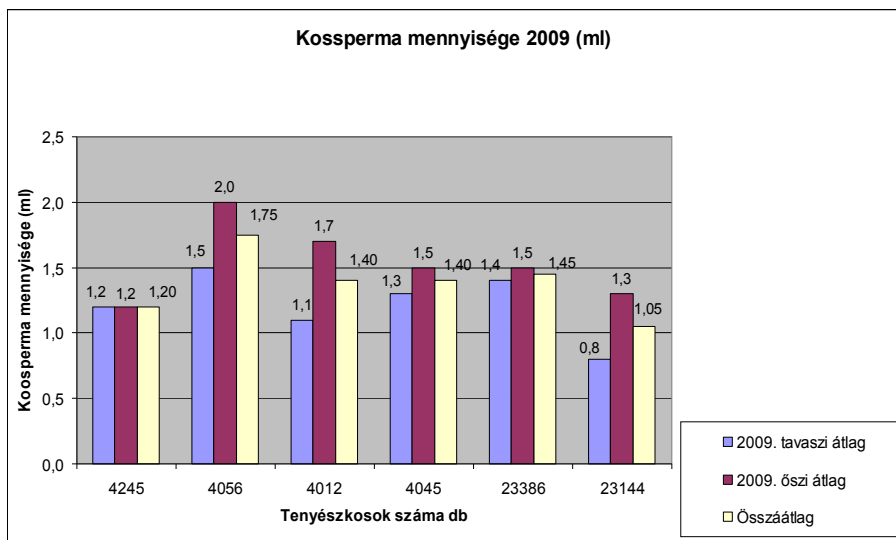
$$n=20; n_{\text{tavasz}}=10; n_{\text{ősz}}=10$$

Kossperma mennyisége 2009 (ml)						
Mintavétel dátuma	Tenyészkosok száma					
	4245	4056	4012	4045	23386	23144
2009. tavaszi átlag	1,2	1,5	1,1	1,3	1,4	0,8
2009. őszi átlag	1,2	2	1,7	1,5	1,5	1,3
Átlag	1,2	1,6	1,3	1,4	1,5	1

### 30. diagram: Kossperma mennyisége (ml)

Minták száma minden vizsgálatba bevont kos esetében

$$n=20; n_{tavasz}=10; n_{\text{ősz}}=10$$



#### 4.4.2. Dekapacitáló faktorok használatának élősejtszámra gyakorolt hatása

Megfigyeléseink szerint a dekapacitáló faktorok szintén hatást gyakorolnak a mélyhűtés után visszamelegített minták élősejtszámára. A dekapacitáló faktorokat tartalmazó oldatokról elmondható, hogy általában pozitív irányba befolyásolják az élősejtszámot, ám esetükben sem mindegy, hogy a visszamelegítő oldatokban melyik állat szaporító anyagához melyik állat vérsavóját használjuk dekapacitáló faktorokat tartalmazó anyagként.

42. táblázat: Dekapacitáló faktorok élősejtszámra gyakorolt hatása 2009-es minták esetében  
(*n* = a tenyészkosoktól vett minták száma)

Dekapacitáló faktorok élősejtszámra gyakorolt hatása 2009-es minták esetében (Átlageredmények alapján)						
Visszamelegítő oldatok	Élősejtszám a különböző vizsgált állatok mintái esetében (%)					
	4245 n=10	4056 n=10	4012 n=10	4045 n=10	23386 n=10	23144 n=10
Élősejtszám % testhőmérsékleten	68%	69%	68%	65%	58%	60%
Kontrol visszamelegítő oldat: PBS (foszfát puffer oldat)	23%	19%	18%	23%	15%	25%
1. számú visszamelegítő oldat: PBS (foszfát puffer oldat) + spermaplazma	23%	22% (+3%)	13%	38% (+15%)	23% (+8%)	30% (+5%)
2. számú visszamelegítő oldat: PBS (foszfát puffer oldat) + anyajuhtól származó vérsavó (fűlszám: 8181)	16%	9%	0%	Na.	25% (+10%)	Na.
3. számú visszamelegítő oldat: PBS (foszfát puffer oldat) + anyajuhtól származó vérsavó (fűlszám: 8211)	18%	14,38%	0%	Na.	15%	Na.
4. számú visszamelegítő oldat: PBS (foszfát puffer oldat) + kostól származó vérsavó (fűlszám: 4245)	18%	15%	0%	Na.	20% (+5%)	Na.
5. számú visszamelegítő oldat: PBS (foszfát puffer oldat) + kostól származó vérsavó (fűlszám: 4056)	20%	20% (+1%)	16%	30% (+7%)	20% (+5%)	20%
6. számú visszamelegítő oldat: PBS (foszfát puffer oldat) + kostól származó vérsavó (fűlszám: 4012)	20%	10%	1,50%	32,5% (+9,5%)	32,5% (+17,5%)	Na.
Jelmagyarázat						Kontrol minták
						10%-20%
						5%-9,9%
						1%-4,9%
						Nincs adat



### 4.4.3. Dekapacitáló faktorokat tartalmazó oldatok hatása a dekapacitációs folyamatokra a visszamelegítést követően

43. táblázat: Különböző dekapacitáló faktorokat tartalmazó oldatok hatása a vizsgált csoportba tartozó kosok mélyhűtött szaporító anyagának dekapacitációjára a visszamelegítést követően (n= a tenyészkosoktól vett minták száma)

Különböző dekapacitáló faktorokat tartalmazó oldatok hatása a vizsgált csoportba tartozó kosok mélyhűtött szaporító anyagának dekapacitációjára a visszamelegítést követően								
Visszamelegítő oldatok	Különböző állatoktól származó mélyhűtött minták esetében elért dekapacitáció a felolvasztás után (%)							
	4245 n=6	4056 n=3	4012 n=3	4045 n=3	23386 n=3	23144 n=3		
Kontrol visszamelegítő oldat: PBS (foszfát puffer oldat)	0%	0%	0%	0%	0%	0%		
1. számú visszamelegítő oldat: PBS (foszfát puffer oldat) + sperm plazma	1,5% <b>23%</b> 21% 2% 15%	<b>20%</b> <b>29%</b> 6%	<b>26%</b> <b>22%</b>	8% 5,5%	<b>24%</b> <b>30%</b>	0%		
2. számú visszamelegítő oldat: PBS (foszfát puffer oldat) + anyajuhtól származó vérsavó (fülszám: 8181)	<b>20,5%</b> 9,5%	40%	9,5% 6,5%	<b>Na.</b>	<b>23%</b>	0%		
3. számú visszamelegítő oldat: PBS (foszfát puffer oldat) + anyajuhtól származó vérsavó (fülszám: 8211)	<b>40%</b>	7,5% <b>39,5%</b>	7,5% 10,5%	5,50%	4%	0%		
4. számú visszamelegítő oldat: PBS (foszfát puffer oldat) + kostól származó vérsavó (fülszám: 4245)	19% 0,5% 19,5% 16,5% 4%	2,5% <b>29%</b>	<b>20%</b> 2,5%	<b>Na.</b>	<b>Na.</b>	<b>Na.</b>		
5. számú visszamelegítő oldat: PBS (foszfát puffer oldat) + kostól származó vérsavó (fülszám: 4056)	2% <b>21%</b> 2,5% 4% 16,5% 1%	6% 12%	13% <b>22%</b>	<b>Na.</b>	11,5% 6,5%	0%		
6. számú visszamelegítő oldat: PBS (foszfát puffer oldat) + kostól származó vérsavó (fülszám: 4012)	12,5% <b>24%</b> 7% 7%	14% <b>31,5%</b>	5,5% 17%	<b>Na.</b>	<b>Na.</b>	0%		
Jelmagyarázat					Kontrol minta			
							<b>20%&lt;</b>	
				<b>Na.</b>	Nincs adat			

A fenti eredmények alapján megállapítható, hogy a spermaplazmát tartalmazó visszamelegítő folyadék szinte kivétel nélkül minden esetben hatékony, azonban a különböző állatoktól származó vérsavók hatékonysága meglehetősen nagy eltéréseket mutat. A különböző anyajuhoktól, illetve tenyészkosoktól származó vérsavók visszamelegítő oldatban adalékanyagként történő felhasználása nagyon eltérő eredményeket hozott a különböző állatok szaporítóanyagának élősejtszámára, illetve ép membránnal rendelkező sejtek arányára kifejtett hatás tekintetében. A vizsgálatok eredményeképpen így megállapítható, hogy a vérsavók visszamelegítő oldatban történő felhasználása nagyon specifikus. A tapasztalatok alapján azt monhatjuk, hogy a visszamelegítő oldatba adalékként történő használatuk javíthatja a mélyhűtés után visszamelegített szaporítóanyag minőségét. Azonban felhasználásuk tekintetében számos kérdés nyitva maradt.

#### **4.4.4. Inkubációs kísérletek eredménye**

Visszamelegítés után 30-35%-os élősejtszámú minták, 20-27,5%-os élősejtszám eredményeket mutattak 2 órás 39 °C-on történő inkubálás után. Ezen minták laparoszkópos termékenyítésre alkalmasak. A 2009-es minták inkubációs kísérletek eredményei azt mutatják, hogy a mélyhűtött és visszaolvasztott minták cervikouterinális termékenyítésre egyenlőre csupán feltételesen, kizárólag kísérleti célból használhatóak. Meg kell azonban jegyezni, hogy a 2008-as mélyhűtött és visszaolvasztott kossperma eredményei sokkal jobbak a

2009-es eredményekhez képest. Betudható ez akár az időjárás változásainak is, azonban ezen következtetésekhez további elemzésekre és vizsgálatokra van szükség.

*44. táblázat: Hőkimerítő próba során végzett élősejtszám változásának vizsgálata a különböző dekapacitáló faktorokat tartalmazó oldatokban*

Hőkimerítő próba során végzett élősejtszám változásának vizsgálata a különböző dekapacitáló faktorokat tartalmazó oldatokban						
	Kosok fűlszáma					
	4245 n=5		4012 n=5		23386 n=5	
Mélyhűtés előtt krioprotektív anyagot nem tartalmazó (I.-es hígítóban)	70%		70%		70%	
Hőkimerítő próba (39°C, 2h)	előtt	után	előtt	után	előtt	után
Kontrol visszamelegítő oldat PBS (foszfát puffer oldat)	25%	20%	30%	20%	20%	12,50%
1. számú oldat: PBS (foszfát puffer oldat) + spermaplazma	30%	25%	35%	27,50%	25%	5%
2. számú visszamelegítő oldat: PBS (foszfát puffer oldat) + anyajuhtól származó vérsavó (fűlszám: 8181)	10%	5%	25%	7,50%	7,50%	2%
3. számú visszamelegítő oldat: PBS (foszfát puffer oldat) + anyajuhtól származó vérsavó (fűlszám: 8211)	20%	12,50%	17,50%	10%	17,50%	15%
4. számú visszamelegítő oldat: PBS (foszfát puffer oldat) + kostól származó vérsavó (fűlszám: 4245)	25%	22,50%	30%	27,50%	30%	22,50%
5. számú visszamelegítő oldat: PBS (foszfát puffer oldat) + kostól származó vérsavó (fűlszám: 4056)	32,50%	17,50%	15%	15%	20%	10%
6. számú visszamelegítő oldat: PBS (foszfát puffer oldat) + kostól származó vérsavó (fűlszám: 4012)	30%	10%	25%	15%	32,50%	22,50%
Jelmagyarázat	Kontrol minták élősejtszáma%					
	Magasabb élősejtszám %, mint a kontrol minta.					

## **5. KÖVETKEZTETÉSEK**

### **5.1. A 2007-ben hígított 2-4°C-on hűtött szaporítóanyag élősejtszám % eredményeiből levonható következtetések**

Az élősejtszám % meghatározását először közvetlenül a spermavétel után végeztük, majd az 1, illetve 2 napos 2-4 °C-on történő tárolás után.

A vizsgálat eredményeképpen megállapítható, hogy a vizsgált négy minta közül a két napos 2-4°C-on történő tárolást követően két kos, nevezetesen a 4045 és 4245-ös kos szaporító anyagának élősejtszám % átlageredményei alapján 60%-os eredmény volt mérhető, amely azt jelenti, hogy a szaporító anyag általában 2 napos 2-4°C-os tárolás után is mesterséges termékenyítésre alkalmas.

### **5.2. Hígított 2-4°C-on hűtött szaporítóanyag eredményei sejtmembrán és akroszóma állapotának 2007. évi vizsgálati eredményeiből levonható következtetések**

A CTC fluoreszcens festési eljárással végzett sejtmembrán és akroszóma vizsgálatnál azonban a 4056-os állat szaporítóanyag bizonyult legjobbnak. A két vizsgálatot összevetve azonban mégis kijelenthetjük, hogy a 4056-os kos termékenyítő anyagával való cervikouterinális termékenyítésre csupán 1 napos 2-4 °C-os termékenyítés után javasolható. A 4012, illetve 4045-ös kosok mintáinak átlageredményei esetében szintén a maximum 1 napos 2-4°C-os hűtés utáni termékenyítés javasolható. A 4245-ös minta

átlageredményei alapján azonban csupán a frissen hígított spermával történő termékenyítés javasolható, ugyanis a membrán fluoreszcens vizsgálatok eredményei alapján a 4245-ös kos szaporító anyaga bírta a legkevésbé a 2-4°C-on történő hűtve tárolást. Esetében, ha hűtve tárolásra kerül sor mindenképpen a hígítás során hozzáadott dekapacitáló faktorok használatára van szükség.

### **5.3. Hígított 2-4°C-on hűtött szaporítóanyaggal történő sikeres termékenyítések százalékos arányának 2007. évi eredményeiből levonható következtetések**

A hígított 2-4°C-on hűtött kosspermával az állományban történő sikeres termékenyítések száma (ellési% alapján) a nem kísérleti célból termékenyített kezeletlen anyajuhokon végrehajtott termékenyítések esetében a 2007-es évben állományszinten 61,59% volt. Érdekes megfigyelni, hogy a kísérletek során termékenyített, illetve ivarzásszinkronizált állatok esetében ez az arány 70,58%. Valószínűleg mindezt a kisebb egyedszám és még a szokásosnál is nagyobb odafigyelés, valamint a kísérletek során számos esetben alkalmazott ivarzás szinkronizálás eredményezi. Sikeres termékenyítések tekintetében a 4245-ös, 4056-os, illetve 299-es kosok szaporítóanyaga bizonyult leghatékonyabbnak. A kísérleti termékenyítések esetében azonban a 4012-es kos szaporítóanyaga jelentősen jobb eredményt ért el. Összességében elmondható, hogy az átlag feletti eredmények jónak mondhatóak. A kísérleti termékenyítések esetében pedig a szokásosnál is gondosabb munka és

nagyobb odafigyelés és az ivarzásszinkronizálás még jobb eredményt hozott.

#### **5.4. Mélyhűtésre való alkalmasság meghatározása CTC fluoreszcens festési eljárással végzett fázisvizsgálatok eredményei alapján**

Ezen vizsgálatok során a különböző állatok szaporító anyagának mélyhűtésre való alkalmasságának vizsgálatát végeztem a mélyhűtésre történő előkészítés különböző fázisaiban fénymikroszkópos élősejtszám meghatározás és CTC fluoreszcens festési eljárással végzett membrán és akroszóma elváltozásainak vizsgálata során az alábbi következtetések vonhatóak le:

A visszamelegítés során a legjobb eredményt a 299-es ENAR számú kos spermája érte el. Mindkét dekapacitáló faktorra az összes közül a legjobban reagált.

PBS-ben visszaolvasztva az ép membránnal rendelkezők közül az utolsó helyre került 29,5%-os eredménnyel, de a dekapacitáló faktorok segítségével 77%, illetve 66%-os az ép membránnal rendelkezők aránya.

A spermaplazmára, mint dekapacitáló faktort tartalmazó komponensre a 299, 4012, 4056, 4045 és 23386-os kosok reagáltak jobban, bár meg kell jegyezni, hogy a 23386-os kos hígított spermájában az ép membránnal rendelkező spermiumsejtjeinek aránya a PBS-hez

hozzáadott vérsavó esetében sem maradt el sokkal, csupán 1,5%-al a PBS+spermaplazmában történő visszamelegítés eredményeitől.

A vérsavóval, mint dekapacitáló faktort tartalmazó PBS-ben történő visszamelegítés után az előbb említett 23386-os és 23144-es állatok hígított spermája ért el jobb eredményt. 23144-es állat szaporító anyaga volt az egyetlen, amely a vérsavóra jobban reagált, bár a PBS-ben történő visszamelegítésre vonatkozó eredményünk nincs, így tehát nem tudjuk egyértelműen kijelenteni, hogy jobb, vagy rosszabb lett annál.

Jimmy 001-es számú bakkecskétől vett mélyhűtés után visszamelegített szaporítóanyag rosszul reagált mindkét dekapacitáló faktorra, ugyanis ez esetben a dekapacitáló faktort tartalmazó komponensek jelenléte a visszamelegítő oldatban ugyan kis mértékben, de csökkentette az ép membránnal rendelkezők arányát. Jelen esetben ez azzal magyarázható, hogy egy másik állatfaj a juh spermaplazmáját és vérsavóját adtuk a PBS oldathoz. Bizonyára jobb eredményeket kaptunk volna, ha a bakkecskéjét használjuk. Az mindenesetre megállapítható, hogy még ennek ellenére is viszonylag sok az ép membránnal rendelkezők aránya a PBS-ben visszamelegítetttnél a 2. legjobb, de a „vérplazmával dúsított” oldatban is a 3. és még a spermaplazmával „dúsítottnál” is az 5. helyen áll a 8 közül. Igaz, hogy a 20°C-os fázisban az ép membránnal rendelkezők aránya Jimmy 001 esetében volt a legmagasabb, szám szerint 81%.

A kapacitáción átesett spermiumok arányával kapcsolatban érdemes megjegyezni, hogy a dekapacitáló faktorokat tartalmazó komponensek különösen a spermaplazma estében az egyes kosoktól és tenyészbaktól származó mélyhűtés után visszaolvasztott mintákon a kapacitáción átesett spermiumsejtek aránya legalább olyan mértékben csökken, mint amilyen mértékben az ép membránnal rendelkező spermiumsejtek aránya növekszik. Ebből látszik, hogy a dekapacitáló faktorok ténylegesen kifejtik hatásukat.

A következő kosoknál ez különösen jól látható a diagramokon: 4012, 4045, 4056, 23386, 299-es ENAR számú állatok esetében a spermaplazma dekapacitáló faktorai fejtették ki látványosan hatásukat, 23144-es kosnál pedig a vérsavó dekapacitáló faktorának pozitív hatása figyelhető meg a diagramon.

Az akroszóma-reakción átesettek száma minden esetben látványosan megemelkedett a mélyhűtés utáni visszamelegítést követően.

### **5.5. Mélyhűtésre való alkalmasság meghatározása fénymikroszkóppal végzett vizsgálatok eredményei alapján**

A fénymikroszpos vizsgálatok esetén a hígított és mélyhűtés után visszamelegített kossperma élő és jól mozgó sejtjeinek száma alapján tudunk következtetni a termékenyítő képességre.

Az egyes ejakulátumok termékenyítőképességének meghatározása során először a fénymikroszkópos vizsgálatok során értékeljük az élő és jól mozgó sejtek arányát, majd ezen eredményeket fluoreszcens



festés segítségével végzett ép membránnal rendelkező, kapacitáción- és akroszóma-reakción átesett spermiumok arányát határozzuk meg. A két vizsgálati módszer együtt alkalmazása segítséget nyújthat nekünk a mélyhűtött kos- és baksperma termékenyítésre alkalmasságának ellenőrzésében és minőségbiztosításában, hogy a mélyhűtött kos- és baksperma értékesítésre kerülhessen.

Megfelelő visszaigazolást azonban csak a termékenyítési eredmények, az ún. non-return index és az ellési % adhat majd.

Az állatok szaporító anyagának egyedi alkalmasságának meghatározása és a dekapitációs faktorok hatékonyságának vizsgálatán túl a mélyhűtéssel kapcsolatban egyéb tapasztalatok is levonhatóak, mint például:

- az optimális equilibráltatási idő 1,5 óra
- a mélyhűtésre használt 2. számú hígítóhoz krioprotektív anyagként adagolt analitikai tisztaságú glicerin nagyban javíthatja az eredményeket.

#### **5.6. Következtetések, javaslatok a 2008-ban végzett évszakhatás vizsgálatral kapcsolatban**

- Az általunk végzett ősszel és tavasszal vett kossperma mélyhűtése és visszamelegítése során elvégzett fázisvizsgálatainak eredményeiből kiderül, hogy az őszi sperma jobb minőségű, mélyhűtésre alkalmasabb.

- Létezik szezonális a kosoknál is, amely a klimatikus viszonyoktól, adott féltekén, szélességi körön való elhelyezkedéstől is függ, hiszen Ismaya (2003) vizsgálatai szerint a déli féltekén a nappalok hosszabbodásával nő a kosspermatermelés mennyisége és javul minősége. Ezzel szemben az északi féltekén ősszel van a fő tenyészszézon, amikor a nappalok egyre rövidebbek. A Pharmagene-Farm Kft-nél végzett vizsgálatok eredményei is azt mutatják, hogy az őszi kossperma minősége a jobb. Ez a vizsgálat is azt igazolja, hogy kosoknál is megfigyelhető az évszakhatás.
- Véleményem szerint további vizsgálatokat kellene végezni az év különböző hónapjaiban, hogy további eredményekkel bizonyítsuk a szezonális létezését a kosoknál is. Frissen vett és hígított sperma élősejtszám és spermamennyiség, spermasűrűség, sejtmembrán és akroszóma állapotának vizsgálatát javaslom.
- Rögzíteni kellene a klimatikus viszonyokat az év különböző hónapjaiban, különösen a spermavételek időszakában. Klimatikus viszonyok megfigyelése és rögzítése együtt értékelendő a kossperma minőséggel.
- Sűrűségmérés adataival is ki kellene egészíteni, hogy hogyan hat az évszakhatás és a klimatikus viszonyok hatása a kosok spermatermelésére.
- Termékenyítés mélyhűtött spermával: Erre vonatkozólag csak korlátozott számban állnak rendelkezésre adatok. A 299-es kos mélyhűtött spermájával történt termékenyítés NR-index 43%. Ha ebből a termékenyítésből születnek bárányok, meglesznek az ellési % eredményei is.

- A továbbiakban a CTC fluoreszcens festési eljárás mellett a Kovács-Foote féle festési eljárást is szeretnénk alkalmazni, amely további információt ad az élő/elhalt sejtek arányáról, motilitásról és az akroszóma-reakción átesett illetve akroszóma hiányos, vagy –sérült sejtek arányáról.

### **5.7. A 2009-ben végzett vizsgálatokra vonatkozó következtetések, javaslatok**

A fenti eredmények alapján egyértelműen az alábbi következtetések vonható le:

A dekapacitáló faktorokat tartalmazó vérsavó és spermaplazma adalékanyagként történő használata a visszamelegítő oldatokban mindenképpen indokolt, de a vérsavókkal dúsított dekapacitáló faktorok használata egyben nagyon specifikus is. A spermaplazma viszont szinte kivétel nélkül javítja az élősejtszámot és a dekapacitáció mértékét a mélyhűtés után visszamelegített mintákban.

A dekapacitációs folyamat vizsgálata szempontjából a dekapacitáló faktorokat tartalmazó anyagok, gondolok itt a különböző állatoktól, anyajuhoktól és tenyészkosoktól származó vérsavók összetételének vizsgálatára, szintén elengedhetetlenül fontos a dekapacitáló faktorokat tartalmazó visszamelegítő oldatok optimális összetételének kidolgozása folyamán. Ez esetben fontos paraméterek lehetnek a kapacitáció szempontjából fontos szerepet játszó ionok ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{HCO}_3^-$ ), továbbá különböző hormonok koncentrációja, valamint a zsírsav- és aminosavösszetétel.

A vizsgálatok folytatása, illetve a Kovács-Foote féle festési eljárással végzett további festés és értékelés, illetve ezen adatok összehasonlítása a CTC fluoreszcens módszerrel történő vizsgálat, illetve élősejtszám eredményekkel mindenképpen javasolható. Ugyanis a Kovács-Foote féle festési eljárással a mozgásképeségről, illetve az akroszóma állapotáról kapunk együttes eredményeket. A CTC fluoreszcens festési eljárás segítségével a membrán- és akroszóma állapotáról kapunk információt. Az élősejtszám egy külön fénymikroszkópos eljárással végzett vizsgálat eredménye. A CTC fluoreszcens festési eljárás előnye viszont, hogy vizsgálható vele a dekapacitáció folyamata. E két festési eljárás együttes alkalmazásával azonban nemcsak több információhoz jutunk a vizsgált minta minőségére vonatkozóan, hanem további ötleteket adhat a termékenyítőanyag termékenyítésre való alkalmasság vizsgálati módszerének továbbfejlesztéséhez is.

## 6. ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK

1. A pelletben mélyhűtött lacaune kossperma mintákban a sejtek dekapacitációjának bekövetkezése a kontroll visszamelegítő oldatban (PBS, foszfátpuffer oldat) meghatározott ép membránnal rendelkező és kapacitáción átesett sejtek arányához viszonyítva a kapacitáción átesett sejtek arányának csökkenésének, illetve az ép membránnal rendelkező sejtek növekedésének vizsgálatával határozható meg. Amennyiben a dekapacitáló faktorokat tartalmazó visszamelegítő oldatokban (PBS + spermaplazma, PBS + vérsavó) a kontrol oldatként szolgáló PBS oldatban jelenlévő ép membránnal rendelkező, illetve kapacitáción átesett sejtek arányához képest az ép membránnal rendelkező sejtek aránya egyidejűleg növekszik, a dekapacitáción átesett sejtek arányának csökkenésével, akkor beszélhetünk dekapacitációról.

2. A dekapacitáció mértéke a kontrol oldatként szolgáló, foszfátpuffert tartalmazó visszamelegítő oldatban (PBS) jelenlévő ép membránnal rendelkező és kapacitáción átesett sejtek arányához viszonyítva az adalékolt dekapacitáló faktorokat tartalmazó oldatokban (PBS + spermaplazma, PBS + vérsavó) az ép membránnal rendelkező sejtek arányának növekedésével határozható meg, azzal a feltétellel, hogy a kapacitációszerű elváltozáson átesett sejtek aránya legalább annyival csökken, mint amennyivel az ép membránnal rendelkező sejtek aránya növekszik.

3. A pelletben mélyhűtött majd visszaolvasztott lacaune kossperma minták esetében a foszfátpuffert tartalmazó spermaplazmával adalékolt visszamelegítő oldat élősejtszámra és kapacitációs állapotra gyakorolt hatásának vizsgálata során a szerző azt tapasztalta, hogy a spermaplazmával adalékolt foszfátpuffer tartalmazó visszamelegítő oldat a pelletben mélyhűtést követően visszamelegített lacaune kossperma minták esetében az élő és jól mozgó spermiumsejtek arányára és azok kapacitációs állapotára egyaránt pozitív hatással volt.

4. A szerző által végzett vizsgálatok eredményeként megállapítható volt, hogy a visszamelegítő oldatban adalékanyagként használt vérsavó javíthatja a pelletben történő mélyhűtés után visszamelegített lacaune kossperma élősejtszámát, illetve dekapacitációs állapotát. A különböző állatoktól származó vérsavók hatása azonban nagyon specifikus. Egyedenként teljesen eltérő hatást érhetünk el.

5. A visszamelegítő oldathoz adalékolt vérsavó mélyhűtés után visszamelegített lacaune kossperma élősejtszámára, illetve kapacitációs állapotára gyakorolt hatása a különböző állatoktól származó vérsavók különböző összetételétől függ. Nagy valószínűség szerint a  $\text{Ca}^{2+}$ , illetve  $\text{HCO}_3^-$  koncentrációjától függ a legnagyobb mértékben, mivel ezek az ionok játszanak szerepet a kapacitáció és akroszóma-reakció lejátszódásában.

6. Megállapítható, hogy az ősszel, illetve tavasszal vett ejakulátumokból készített spermaplazma egyaránt felhasználható a visszamelegítő oldatokban dekapacitáló faktorokat tartalmazó természetes adalékanyagként. Domingez és mtsai. (2008) szerint ugyanis kizárólag az ősszel vett szaporító anyagból előállított spermaplazma hatékony dekapacitáló adalékanyagként.

7. A szerző által végzett vizsgálatok alapján megállapítható, hogy az őszi főszézonban a vizsgált lacaune kosok ejakulátumában előforduló akroszóma-reakción átesett sejtek százalékos aránya magasabb, mint a tavaszi pótszézonban.

## 7. ÖSSZEFOGLALÁS

A kossperma mélyhűtés kérdése napjainkban még nem egyértelműen megoldott. A különböző mélyhűtési eljárások műszalmában és pelletben mélyhűtött termékenyítőanyag sok esetben kizárólag sebészeti úton, vagy félsebészeti úton laparoszkópos eljárással a méhszarvakba juttatott termékenyítő anyaggal lehetséges. Az ilyen úton történő termékenyítést már 35-40%-os élősejtszámmal rendelkező termékenyítő anyaggal eredményesen lehet végezni, azonban a termékenyítő katéterrel elvégzendő cervikouterinális úton végzett eredményes termékenyítéshez már 60-65%-os élősejtszámmal rendelkező termékenyítő anyagra van szükség. Ennek előállítása pedig nagyon bonyolult feladat. A mélyhűtés során elég ha a rendszerbe egy apró hiba kerül, s az egész napi munka kárba vész.

Disszertációm a Pharmagene-Farm Kft-nél 2007-2009 közötti időszakban végzett vizsgálatok eredményeiből készítettem el, melynek során vizsgáltam a tavaszi és őszi kossperma mennyiségét, minőségét, illetve 2-4°C-os hűtésre, illetve mélyhűtésre való alkalmasságát hét lacaune kos és egy bakkecske bevonásával. A kosok frissen vett spermájának mennyiségét, élősejtszámát, illetve a mélyhűtött és visszamelegített sperma élősejtszámát, valamint a kapacitációszerű membránváltozáson és akroszóma-reakción átesett spermiumsejtek aránya is meghatározásra került. A mélyhűtés egyes fázisaiban, a vizsgálatok során a különböző összetételű dekapacitáló oldatok hatékonyságát élősejtszám % meghatározással, valamint a



kapacitációszerű elváltozáson, illetve az ép membránnal rendelkező sejtek arányának változásának vizsgálatával, valamint inkubációs kísérletekkel vizsgáltam a spermiumsejtek életképességét a visszamelegítést követően. A vizsgálatok célja a mélyhűtésre legalakalmasabb szaporítóanyag begyűjtése, 2-4°C-on hűtött, majd a mélyhűtés után visszaolvasztott szaporítóanyag előállítás technológiájának fejlesztése a lehető legjobb minőségű szaporítóanyag előállítása érdekében.

2007. év őszén a különböző kosok szaporító anyagainak frissen vett, hígított, illetve 2-4°C-on való tárolás során történő vizsgáltam. A vizsgálatok között szerepelt fénymikroszkóp alatt történő élősejtszám meghatározás, CTC fluoreszcens festési eljárással történő ép membránnal rendelkező kapacitációszerű elváltozáson, illetve akroszóma-reakción átesett sejtek arányának meghatározása, valamint a különböző kosok szaporító anyagának tesztelése termékenyítésre való felhasználás során, ezen vizsgálatnál külön értékelte a kísérletekhez felhasznált szaporító anyaggal végzett termékenyítések sikerességét, amelynél meglepő módon jobb eredményt kaptam, mint a napi gyakorlat során felhasznált termékenyítőanyag esetében. A vizsgálatok során először a közvetlenül a spermavételt követően, majd az azt követő 1, illetve 2 napos 2-4°C-on történő tárolás során történt meg az élősejtszám% meghatározása. A vizsgálat eredményeképpen megállapítható volt, hogy a vizsgált négy minta közül a két napos 2-4°C-on történő tárolást követően két kos, nevezetesen a 4045 és 4245-ös kos szaporító anyagának élősejtszám % átlageredményei alapján

60%-os eredmény volt mérhető, amely azt jelenti, hogy a szaporító anyag általában 2 napos 2-4°C-os tárolás után is alkalmas mesterséges termékenyítésre. A CTC fluoreszcens festési eljárással végzett sejtmembrán és akroszóma vizsgálatnál azonban a 4056-os állat szaporítóanyag bizonyult legjobbnak. A két vizsgálatot összevetve azonban mégis kijelenthetjük, hogy a 4056-os kos termékenyítő anyagával való cervikouterinális termékenyítésre csupán 1 napos 2-4°C-os termékenyítés után javasolható. A 4012, illetve 4045-ös kosok mintáinak átlageredményei esetében szintén a maximum 1 napos 2-4°C-os hűtés utáni termékenyítés javasolható. A 4245-ös minta átlageredményei alapján azonban csupán a frissen hígított spermával történő termékenyítés javasolható, ugyanis a membrán fluoreszcens vizsgálatok eredményei alapján a 4245-ös kos szaporítóanyaga bírta a legkevésbé a 2-4°C-on történő hűtve tárolást. A hígított 2-4°C-on hűtött kosspermával az állományban végzett sikeres termékenyítések száma a nem kísérleti célból és nem ivarzásszinkronizált anyajuhokon végrehajtott termékenyítések esetében a 2007-es évben állományszinten 61,59% volt. Érdekes megfigyelni, hogy a kísérletek során termékenyített, illetve ivarzásszinkronizált állatok esetében ez az arány 70,58%.

Kossperma mélyhűtésre való alkalmasságának vizsgálata fázisvizsgálatok során membrán- és akroszóma különböző arányban megfigyelhető elváltozásainak meghatározásával történt az előkészítés, mélyhűtés és visszamelegítés során 2008. évi tavasszal gyűjtött szaporítóanyag minták adatai alapján. Az eredményekből

látszik, hogy a Jimmy 001-nek nevezett bakkecske spermája bírta legjobban a mélyhűtést, itt átlagban 64,8-61,15 % között volt az ép membránnal rendelkező sejtek aránya. Igaz a mélyhűtés az összes közül a legmagasabb előtt 81%-ról indult. Az ép sejtmembrán tekintetében jól bírták még a mélyhűtést a 4245, a 23386, a 4012. A 4056-os kosoktól származó minták és 23144-es kosoktól származó szaporítóanyag minta is kifejezetten jól reagált a dekapacitáló faktorokkal végzett kezelésre. Fénymikroszkóppal végzett élősejtszám % meghatározás tekintetében a visszaolvasás után kiemelkedő eredményt ért el a 4056-os számú kos, amely dekapacitáló faktor hozzáadásával 35-40%, sőt esetenként 40-45%-os élősejtszámot is elérte, ami mélyhűtött kossperma esetében jónak mondható eredmény. Ez a termékenyítőanyag már biztonságosan felhasználható. A mélyhűtött baksperma esetében az élősejtszám 35-50 % körüli volt. A 4045 ahol a visszaolvasztás utáni élősejtszámot vizsgálva 45-40 %, sőt egy esetben 60 %-os eredmény is született. A CTC fluoreszcens festési eljárással végzett dekapacitációs vizsgálatok eredményeként a legjobb eredményt a 299-es ENAR számú kos spermája érte el. Mindkét dekapacitáló faktorra az összes közül a legjobban reagált. PBS-ben visszaolvasztva az ép membránnal rendelkezők közül az utolsó helyre került 29,5%-os eredménnyel, de a dekapacitáló faktorok segítségével 77%, illetve 66%-os az ép membránnal rendelkezők aránya. A spermaplazma, mint dekapacitáló faktort tartalmazó komponensre a 299, 4012, 4056, 4045 és 23386-os kosok reagáltak jobban, bár meg kell jegyezni, hogy a 23386-os ép membránnal rendelkező hígított spermájában a spermiumsejtek aránya a PBS-hez

hozzáadott vérsavó esetében sem maradt el sokkal. Csupán 1,5%-al a PBS+spermaplazmában történő visszamelegítés eredményeitől. A vérsavóval, mint dekapacitáló faktort tartalmazó PBS-ben történő visszamelegítés után az előbb említett 23386-os és 23144-es állatok hígított spermája ért el jobb eredményt. Jimmy 001-es számú bakkecskétől vett mélyhűtés után visszamelegített szaporítóanyag rosszul reagált mindkét dekapacitáló faktorra, ugyanis ez esetben a dekapacitáló faktort tartalmazó komponensek jelenléte a visszamelegítő oldatban ugyan kis mértékben, de csökkentette az ép membránnal rendelkezők arányát. Jelen esetben ez érthető is, mivel itt egy másik állatfaj a juh spermaplazmáját és vérsavóját adtuk a PBS oldathoz. Bizonyára jobb eredményeket kaptunk volna, ha a bakkecskét használjuk.

Évszakhatás vizsgálat mélyhűtésre való alkalmasság tekintetében 2008. tavaszi és őszi adatok alapján zajlott. Ezen vizsgálat során meghatározásra került az ejakulátumok mennyisége, élősejtszáma és a mélyhűtés után PBS, valamint különböző dekapacitáló faktorokat tartalmazó oldatokban a visszamelegítést követően a membrán-, illetve akroszóma állapotának vizsgálata is megtörtént. Az ősszel és tavasszal vett kosperma mélyhűtése és visszamelegítése során elvégzett fázisvizsgálatok eredményeiből kiderül, hogy az őszi sperma jobb minőségű, mélyhűtésre alkalmasabb. Létezik tehát szezonális különbség a kosoknál is, amely a klimatikus viszonyoktól, adott féltekén, szélességi körön való elhelyezkedéstől is függ, hiszen Ismaya (2003) vizsgálatai szerint a déli féltekén a nappalok hosszabbodásával nő

kospermatermelés mennyisége és javul minősége. Ezzel szemben az északi féltekén ősszel van a fő tenyészszezon, amikor a nappalok egyre rövidebbek. A Pharmagene-Farm Kft-nél végzett vizsgálatok eredményei is azt mutatják, hogy az őszi kosperma minősége a jobb. Ez a vizsgálat is azt igazolja, hogy kosoknál is megfigyelhető az évszakhatás.

A 2007-2009-ig végzett vizsgálatok eredményei alapján egyaránt megállapítható, hogy a tenyészkosoktól a főszezon, azaz az őszi folyamán vett minták mennyisége több a tavasziénál.

A 2008-2009-ben végzett vizsgálatok eredményei azt igazolják, hogy a dekapacitáló faktorokat tartalmazó oldatok általában pozitív irányban befolyásolják az élősejtszámot, ám esetükben sem mindegy, hogy a visszamelegítő oldatokban egy adott állat szaporító anyagához melyik állat vérsavóját használjuk dekapacitáló faktorokat tartalmazó anyagként.

A 2009-es évben végzett dekapacitáló faktorok hatékonyságának vizsgálata során kapott eredmények alapján megállapítható, hogy a spermaplazmát tartalmazó visszamelegítő folyadék szinte kivétel nélkül minden esetben hatékony, azonban a különböző állatoktól származó vérsavók hatékonysága meglehetősen nagy eltéréseket mutat. A különböző anyajuhoktól, illetve tenyészkosoktól származó vérsavók visszamelegítő oldatban adalékanyagként történő felhasználása nagyon eltérő eredményeket hozott a különböző állatok szaporítóanyagának élősejtszámára, illetve ép membránnal rendelkező

sejtek arányára kifejtett hatás tekintetében. A vizsgálatok eredményeképpen így megállapítható, hogy a vérsavók visszamelegítő oldatban történő felhasználása nagyon specifikus. A tapasztalatok alapján azt monhatjuk, hogy a visszamelegítő oldatba adalékként történő használatuk javíthatja a mélyhűtés után visszamelegített szaporítóanyag minőségét. Azonban felhasználásuk tekintetében számos kérdés nyitva maradt. Összetételükben, valószínűleg a  $\text{Ca}^{2+}$  és  $\text{HCO}_3^-$  ionok aránya lehet a meghatározó, mivel ezen ionok játszanak szerepet a kapacitáció és az akroszóma-reakció során. A vizsgálatok folytatása során ezen összetevők koncentrációjának vizsgálata javasolható. Ezen kívül az oldatok zsírsav, illetve aminosav összetétele is rendkívül fontos lehet.

A 2009-ben végzett inkubációs vizsgálatok eredményei alapján megállapítható, hogy a visszamelegítés után 30-35%-os élősejtszámú minták, 20-27,5%-os élősejtszám eredményeket mutattak 2 órás 39°C-on történő inkubálás után. Ezen minták laparoszkópos termékenyítésre alkalmasak. A 2009-es minták inkubációs kísérletek eredményei azt mutatják, hogy a mélyhűtött és visszaolvasztott minták cervikouterinális termékenyítésre egyenlőre csupán feltételesen kizárólag kísérleti célból használhatóak. Meg kell azonban jegyezni, hogy a 2008-as mélyhűtött és visszaolvasztott kossperma eredményei sokkal jobbak a 2009-es eredményekhez képest. Betudható ez akár az időjárás változásainak is, azonban ezen következtetésekhez további elemzésekre és vizsgálatokra van szükség. A dekapacitáló faktorokat tartalmazó vérsavó és spermaplazma adalékanyagként történő

használata a visszamelegítő oldatokban mindenképpen indokolt, de a vérsavókkal dúsított dekapacitáló faktorok használata egyben nagyon specifikus is. A spermaplazma viszont szinte kivétel nélkül az összes minta esetében javítja az élősejtszámot és a dekapacitáció mértékét a mélyhűtés utáni visszamelegítést követő inkubáció során.

A vizsgálatok folytatása, illetve a Kovács-Foote féle festési eljárással végzett további festés és értékelés, illetve ezen adatok összehasonlítása a CTC fluoreszcens módszerrel történő vizsgálat, illetve élősejtszám eredményekkel mindenképpen javasolható. Ugyanis a Kovács-Foote féle festési eljárással a mozgásképességről, illetve az akroszóma állapotáról kapunk együttes eredményeket. A CTC fluoreszcens festési eljárás segítségével csupán a membrán- és akroszóma állapotáról kapunk információt. Az élősejtszám egy külön fénymikroszkópos eljárással végzett vizsgálat eredménye, így nem állapítható meg egy akroszóma-reakción átesett sejtről, hogy mozgásképes e vagy sem. A CTC fluoreszcens festési eljárás előnye viszont, hogy vizsgálható vele a dekapacitáció folyamata. E két festési eljárás együttes alkalmazásával azonban nemcsak több információhoz jutunk a vizsgált minta minőségére vonatkozóan, hanem további ötleteket adhat a termékenyítőanyag termékenyítésre való alkalmasság vizsgálati módszerének továbbfejlesztéséhez is.

## **Köszönetnyilvánítás**

Ezúton mondok köszönetet mindazoknak, akik disszertációm elkészítésében segítettek, név szerint témavezetőmnek Dr. Gergátz Elemérnek a NYME-MÉK nyugalmazott tanárának, a Pharmagene-Farm Kft. ügyvezetőjének, Dr. Gyökér Erzsébet kutató állatorvosnak, a Pharmage-Farm Kft. ügyvezetőjének, a Pharmagene-Farm Kft. minden dolgozójának, akik disszertációm elkészítéséhez szükséges kísérletekben segítettek, Dr. Lengyel Attilának a Kaposvári Egyetem tanárának és Dr. Póti Péter rektorhelyettes úrnak és Dr. Szenczi Ottó professzor úrnak, hogy opponensként segítették disszertációm elkészítését.



## 8. IRODALOMJEGYZÉK

1. ABDELHAKEM, A. A. – GRAHAM, E. F. – VAZQUEZ, I. A. (1991a): Studies on the presence and absence of glycerol in unfrozen and frozen semen: fertility trials and effect of dilution methods on freezing ram semen in the absence of glycerol. *Cryobiology*, 28:36-42.
2. ABDELHAKEM, A. A. – GRAHAM, E. F. – VAZQUEZ, I. A. – CHALONER, K. M. (1991b): Studies on the absence of glycerol in unfrozen and frozen ram semen. *Cryobiology*, 28:43-49.
3. ANDERSEN, K. – AMDAL, J. (1972): Artificial insemination with frozen semen in sheep in Norway *World Rev. Anim. Prod.*, 8:77-79.
4. AMANN, E. P. – GRAHAM, J. K. (1993): Spermatozoal function. In: *Equine reproduction*. Ed: McKinnon. –A.o.- Voss, J. L. – Febiger, L. Philadelphia, London, 715-745 p.
5. ASHWORTH, P.J. – HARRISON, R. A. – MILLER, N. G. – PLUMMER, J. M. – WATSON, P.F. (1994): Survival of ram spermatozoa at high dilution: protective effect of simple constituents of culture media as compared with seminal plasma *Reprod. Fertil. Dev.*, 6: 173-80.
6. BABOCK, D. F. – FIRST, N. L. – LARDY, H. A. (1976): Action of ionophore A23187 at the cellular level. Separation of effects at the plasma mitochondrial membranes. *J. Biol. Chem.*, 251: 3881-3886.

7. BAILEY, J. L. – BILODEAU, J. F. – CORMIER, N. (2000): Semen cryopreservation in domestic animals: a damaging and capacitating phenomenon. *J. Androl*, 21: 1-7.
8. BAKONYI, G. (1995): *Állattan – Mezőgazda Kiadó, Budapest 1995.* 50 p.
9. BARRIOS, B. – FERNANDEZ-JUAN, M. – MUINO-BLANCO, T. – CEBRIAN-PEREZ, J. A. (2005): Immunocytochemical localization and biochemical characterisation of two seminal plasma proteins that protect ram spermatozoa against cold shock. *J. Androl*, 26: 539-49.
10. BARRIOS, B. – PEREZ, R. – GALLEGO, M. – TATO, A. – OSADA, J. – MUINO-BLANCO, T. – CEBRIAN – PEREZ, J. A. (2000): Seminal plasma protein revert the cold-shock damage on ram sperm membrane. *Biol. Reprod.*, 63: 1531-7.
11. BAUER, H. J. – LIENBERG, O. (1976): Untersuchungen zum Einfluß der Verminderung Äquilibrium und des Auftauens von Schlafblock Sperma bei dessen Tiefgefrierkonservierung nach dem Pelletverfahren. *Arch. Tierz.*, 19: 283-293.
12. BERLANDINI, A. – HOZBOR, F. – SANCHEZ, E. – FORNÉS, M.W. – ALBERIO, R. H. – CESARI, A. (2011): Conserved ram seminal plasma proteins bind to the sperm membrane and repair cryopreservation damage – *Theriogenology*, 76: 436-447.

13. BECZE, J. (szerk) (1983): A hímivarú állatok szaporodásbiológiája, Mezőgazda Kiadó, Budapest, 1983.
14. BERNSTEIN, A. D. – PETROPAVLOVSKY, V.V. (1993): Effect of non-electrolytes on viability of spermatozoa. *Bjull. Eksp. Biol. Med.* 3 (1), 41-43 (in Russian)
15. BERRIDGE, M. J. (1975): the interaction of cyclic nucleotides and calcium in the control of cellular activity *Adv. Cyclic. Nucl. Res.*; 6: 1-98.
16. BLACKSHAW, A. W. (1954a): The prevention of temperature shock of bull and ram semen. – *Aust. J. biol. Sci.*, 7: 573-582.
17. BLACKSHAW, A.W. – SALISBURY, G. W. (1957): Factors influencing metabolic activity of bull spermatozoa in cold shock and prevention. *J. Dairy Sci.*, 40: 1099-1106.
18. BLACKSHAW (1960/a): The effects of pH and the temperature of glyceration on the revival of ram and bull spermatozoa after freezing to -79 °C – *Aust. Vet. J.*, 36: 376-379p.
19. BLACKSHAW (1960/b): The effects of milk diluents on the viability of ram spermatozoa and their revival after freezing. – *Aust. Vet. J.*, 432-435p.

20. BLACKSHAW, A.W., EMMENS, C. W. (1995): Survival of deep-frozen mammalian spermatozoa. *Vet. Rec.* 65, 872.
21. BRADLEY, M.P. – FORESTER, I.T. (1980): A ( $\text{Ca}^{2+} + \text{Mg}^{2+}$ ) – ATPase and active  $\text{Ca}^{2+}$  transport in the plasma membranes isolated from ram sperm flagella. *Cell Calcium*, 1:381-390.
22. BRADLEY, M.P. – VAN EERTEN, M.T. W. – FORRESTER, I.T. (1979): The energy-dependent uptake of  $\text{Ca}^{2+}$  by mammalian spermatozoa. *Proc. Univ. Otago Med. Sch.*, 57: 5-7.
23. BREITBART, H. – RUBINSTEIN, S. (1983): Calcium transport by bull spermatozoa plasma membranes. *Biochim. Biophys. Acta*, 732: 464-468.
24. BRETBART, H. – STERN, B. – RUBINSTEIN, S. (1983): Calcium transport and  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase activity in ram spermatozoa plasma membrane vesicles. *Biochim. Biophys. Acta*, 728: 349-355.
25. BRETBART, H. – DARSHAM, R. – RUBINSTEIN, S. (1984): Evidence for presence of ATP-dependent calcium pump ATPase activities in bull sperm head membranes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 122: 479-484.

26. BROKAW, C. J. – JOSSLIN, R. – BOBROW, L. (1974): Calcium ion regulation of flagellar beat symmetry in reactivated sea urchin spermatozoa. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 58: 795-800.
27. COLAS, G. (1975a): Effect of initial freezing temperature addition of glycerol and dilution on the survival and freezing ability of deep-frozen ram semen. *J. Reprod. Fertil.*, 42:277-285.
28. COLAS, G. (1975b): The use of progestagen SC9880 as an aid for artificial insemination in ewes. *Ann Biol. Anim. Biochem. Biophys.*, 15:317-327.
29. COLAS, G. (1972) Fertilité de brebis inséminées avec du sperme frais ou congelé après traitement progestatif, pendant la saison sexuelle. *Proc. 7th Ing. Congr. Anim. A. I.*, 6-9 June 1972, Munich, Vol 2, 927-930.
30. COLAS, G. (1975): Effect of initial freezing temperature, addition of glycerol and dilution on the survival and fertilizing ability of deep-frozen ram semen – *J. Reprod. Fertil.*, 42: 277-285 p.
31. COLAS, G. – BRICE, G. (1970): Fertilité des brebis traitées avec de l'acétate de fluorogestone et inséminées artificiellement avec du sperme congelé: résultats préliminaires. *Ann. Zootech.*, 19:353-357.

32. COLAS, G. – BRICE, G. (1975): Etude des principaux facteurs de survie et de fécondance du sperme bélier après congélation. *Ceres*, 2: 253-260.
33. COLAS, G. – BRICE, G. (1976): Seasonal variation of the fertilizing capacity of deep-frozen ram semen. Proc. 8 th Int. Congr. Anim. Reprod. A. I. 12-16 July 1976, Crakow, Vol. 4., 977-980 p.
34. COLAS, G. - BRICE, G. (1976): Etude des principaux facteurs de survie et de fécondance du sperme de bélier après congélation. – *Ceres*, 2: 253-260 p.
35. COLAS, G. – BRICE, G. – COUROT, M.- COTTIER, M. (1971): L'insemination artificielle dans le plan d'intensification de la production ovine; état actuel et perspectives. *Bull. Tech. Inform.*, No. 257: - 1-6.
36. COLAS, G. – GUÉRIN, Y. (1981): A new method for thawing frozen semen. *Theriogenology*, 16: 623-630.
37. CSABA, GY. (1990): *Sejtbiológia. Medicina*, Budapest
38. CSEH, S. (2009/a): A here endokrin működése című előadás – Válogatott fejezetek az andragógia és az asszisztált reprodukció című a Szent István Egyetem Állatorvostudományi Karának Továbbképző

Intézete által szervezett PhD tanfolyamon elhangzott előadás  
2009.03.30 – 04.02.

39. CSEH, S. (2009/b): Az ivarsejtek és embriók fagyasztásának elméleti alapjai és technikai vonatkozásai című a Szent István Egyetem Állatorvostudományi Karának Továbbképző Intézete által szervezett előadás – Válogatott fejezetek az andragógia és az asszisztált reprodukció című PhD tanfolyamon elhangzott előadás  
2009.03.30 – 04.02.

40. CSEH, S. (2009/c): Az ejakulátum minőségének ellenőrzése című előadás – Válogatott fejezetek az andragógia és az asszisztált reprodukció című a Szent István Egyetem Állatorvostudományi Karának Továbbképző Intézete által szervezett PhD tanfolyamon elhangzott előadás  
2009.03.30 – 04.02.

41. DARNELL, J. – LODISH, H. – BALTIMORE, D. (1986): MOLECULAR CELL BIOLOGY, SCIENTIFIC AMERICAN BOOKS, NEW YORK

42. DAUZIER, L. (1956): Quelques résultats sur l'insémination artificielle des brebis et des chèvres en France. In: Proc. 3rd Int. Congr. Anim. Reprod. E. I., Cambridge vol. 3 pp. 12-14.

43. DAVIS, B.K. (1978): Effect of calcium on motility and fertilization by rat spermatozoa in vitro. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 157: 54-56.

44. DOBOZI, O. (2007): A megtermékenyítés – Semmelweis Egyetem Genetikai Sejt- és Immunbiológiai Intézete 2007. február 7-én elhangzott előadás
45. DOMINQUEZ, M.P. – FALCINELLI, A. – HOZBOR, F. – SANCHEZ, E. – CESARI, A., ALBERTINO, R. H. (2008): Seasonal variations in the composition of ram seminal plasma and its effect on frozen-thawed ram sperm. – *Theriogenology*, 69: 564-73.
46. DOTT, H. M – FOSTER, G. C. (1975): Preservation of differential staining of spermatozoa by formol citrate. *J. Reprod. Fertil.*, 45: 47-56.
47. EL-HAJJ GHAOUI, R. – GILLIAN, L. – THOMSON, P.C. – EVANS, G. – MAXWELL, W. M. (2007): Effect of seminal plasma fraction from entire and vasectomised rams on the motility characteristics, membrane status, and in vitro fertility of ram spermatozoa. *J. Androl*, 28: 109-22.
48. EPPLESTON, J. – ROBERTS, E. M. (1986): The effect of progesteron, PMSG and time of insemination on fertility in ewes following intra-uterine insemination with frozen semen. *Aust. Vet. J.*, 63: 124-125.
49. EPPLESTON, J. – EVANS, G. – ROBERTS, E. M. (1991): effect of time of PMSG and GnRH on the time of ovulation, LH secretion and



reproductive performance after intrauterine insemination with frozen ram semen. *Anim. Reprod. Sci.*, 26: 227-237.

50. EVANS, G. – MAXWELL, W. M.C. (1987): *Salamon's Artificial Insemination of Sheep and Goats* Butterworths, Sydney, 194 pp.

51. EVANS, G. – MCPHIE, C. – MAXWELL, W. M.C. (2000): The effect of seminal plasma on the motility and membrane status of fresh and frozen-thawed ram spermatozoa. *Proceed 14th International Congress on Animal Reproduction 2000*; 2:74.

52. FAHY, G. M. (1986): The relevans of cryopreservation toxicity to cryobiology. *Cryobiology* 23, 1-13.

53. FEREDAN, T. AND BRAGARU, F. L. (1964): Studies on conservation of ram semen by freezing to -79 °C (in Rumanian). *Lucr. Stint. Inst. Cercet. Zootech.*, 21: 375-368.

54. FINDLATER, R. F. C. - HARISON, W. – CURNOCK, R. M. – BECK, N. F. G. (1991): Evaluation of intrauterine insemination of sheep with frozen semen of time of insemination and semen dose on conception rates. *Anim. Prod.*, 53: 89-96.

55. FISHER, P.S. – FAIRFULL, R. W. (1984): The effect of glycerol concentration and cooling velocity on cryosurvival of ram spermatozoa frozen in straws. *Cryobiology*, 21:542-551.

56. FISHER, P.S. AND FAIRFULL, R. W. (1989): The effects of glycerol-related osmotic changes on post-thaw motility and acrosomal integrity of ram spermatozoa. – *Cryobiology*, 26: 64-69 p.
57. GARBERS, D.L. – KOPF, G. S. (1980): The regulation of spermatozoa by calcium and cyclic nucleotides. *Adv. Cyclic. Nucl. Res.*, 13: 252-306.
58. GERGÁTZ, E. (2007): Juhok mesterséges termékenyítése In Pécsi Tamás (2007): Házi és emlősállatok mesterséges termékenyítése – Mezőgazda Kiadó, Budapest 345 p.
59. GILLIAN, L. – EVANS, G. – MAXWELL, W. M.C. (1997): Capacitation status and fertility of fresh and frozen-thawed ram spermatozoa. *Reprod. Fert. Dev.*, 9. 481-487.
60. GÓMEZ, M. C. – CATT, J. W.- GILLIAN, L. – EVANS, G. – MAXWELL, W: M. C. (1997): Effects of culture, incubation and acrosome reaction of fresh and frozen-thawed ram spermatozoa for in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection – *Reprod. Fertil. Dev*, 1997, 9, 665-73.
61. GLOVER, T. E. – WATSON, P.F. (1985): Cold shock and its prevention by egg yolk in spermatozoa of the cat (*Felis catus*). *Cryo-letters*, 6: 239-244.

62. GRAHAM, E. F. – CRABO, B. G. – PACE, M.M. (1978): Current status of semen preservation in the ram, boar and stallion. *J. Anim. Sci.* 47 (Suppl. 2), 80-119.
63. GREEN, D.P.L. (1978): The induction of the acrosome reaction in guinea-pig sperm by the divalent metal cation ionophore A23187. *J. Cell. Sci.*, 32: 34-151.
64. GRAHAM, E. F. - CRABO, B.G. - PACE, M. M. (1978): Current status of semen preservation in the ram, boar, and stallion. – *J. Anim. Sci.*, 47 (Suppl. 2): 80-119 p.
65. HALBERT, G. W. –DOBSON, H. –WALTON, J. S. – BUCKRELL, B.C. (1990): The structure of cervical canal of ewe. *Theriogenology*, 33. 5. 977-992 p.
65. HYNE, R. V. – GARBERS, D.L. (1979a): Calcium-dependent increase in adenosine 3', 5' – monophosphate and incubation of the acrosome reaction in guinea pig spermatozoa. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 76: 5699-5703.
66. HYNE, R. V. – GARBERS, D.L. (1979b): Regulation of guinea pig sperm adenylate cyclase by calcium. *Biol. Reprod.*, 21: 1135-1142.
67. ISMAYA (2003): Influence of the female reproductive tract on the motility and morphological characteristics of ram spermatozoa –

for degree of Doctor of Philosophy in the Australian Institute of Tropical Veterinary and Animal Science, James Cook University Australia

68. IVANOV, I.I. (1907): De la fécondation artificielle chez les mammifères. Arch. Sci. Bio. Imp. Méd. Exp., St Pétersbourg 12, 377-511.

69. IVANOV, I.I. (1912): Artificial Fecondation of Domestic Animals. Schaper, Hannover.

70. JABBOUR, H. N. – EVANS, G. (1991): Fertility of superovulated ewes following intrauterine or oviducal insemination with fresh or frozen-thawed semen. Reprod. Fertil. Dev., 3: 1-7.

71. JAMIL, K. – WHITE, I.G.(1981): Induction of acrosomal reaction in sperm with ionophore A23187 and calcium. Archiv. Androl., 7:283-292.

72. KALEV, G. MARINOV, P. – ZAGORSKI, D. – BAKJRDZHIEV, K. – ZEKOV, G. (1970): Insemination of ewes with semen frozen in different media (in Russian). Zhivotnovodstvo, 9:88

73. KARAGIANNIDIS, A. (1976): The distribubtion of calcium in bovine spermatozoa and seminal plasma in relation to cold shock. J. Reprod. Fertil., 46: 83-90.

74. KERSHAW, C.M. – KHALID, M. – MCGOWAN, M. R. – INGRAM, K. – LEETHONGDEE, S. – WAX, G. – SCARAMUZZI, R.J. (2005): The anatomy of the sheep cervix and its influence on the transcervical passage of an inseminating pipette into the uterine lumen. *Theriogenology*, 64. 5. 1225-1235 p.
75. KISS I. (1995): A hímivarsejt felépítése és képződése In: Bakonyi Gábor (szerk.): *Állattan Mezőgazda Kiadó*, Budapest 47-48. p.
76. KOPF, G. S – GARBERS, D. L. (1980): Calcium and a fructose-sulphate rich polymer regulate sperm cyclic nucleotide metabolism and the acrosome reaction. *Biol. Reprod.* , 22:1118-1126.
77. KOVÁCS GY. – FEHÉR GY. (1966): *Fejlődéstan. Mezőgazdasági Kiadó*, Budapest
78. KOVÁCS A. – FOOTE, R.H. (1992): Viability and acrosome staining of bull, boar and rabbit spermatozoa. *Biot. Histoc.*, 67. 119-124 p.
79. LADHA, S. – JAMES, P. S. – CLARK, D. C. – HOWES, E. A. – JONES, R. (1997): Lateral motility of plasma membrane lipids in bull spermatozoa: heterogeneity between surface domain and rigidification following cell death. *J. Cell Sci.*, 110. 1041-1050 p.

80. LEAHY, T. – MARTI, J. I. – EVANS, G. – MAXWELL, W. M. C. (2009): Seminal plasma protein protect flow-sorted ram spermatozoa from freeze-thaw damage. *Reprod. Fertil. dev.*, 21: 571 – 8.

81. LEAHY, T. – MARTI, J. I. – EVANS, G. – MAXWELL, W. M. C. (2010): Seasonal variation in the protective effect of seminal plasma on frozen-thawed ram spermatozoa – *Animal Reproduction Science* 119 (2010) 147-153. p.

82. LEHNINGER, A. L. – CARAFOLI, E. – ROSSI, C. S. (1969): Energy-linked ion movements in mitochondrial systems. *Adv. Enzymol.* 29: 259-320.

83. LOGINOVA, N. V. – ZHELTOBRJUK, N. A. (1968): Evaluation of different methods of freezing semen (in Russia) *Ovtsevodstvo*, No. 9:22-25.

84. LOPATKO, M.I. (1976): A method of freezing animal semen in media without glycerol and egg yolk. *Proc. 8th Int. Congr. Anim. Reprod. A. I., Crakow vol 4.* pp. 830-833.

85. LOPEZ – BREA, G – PÉREZ – GUZMÁN PALOMARES, M.D. – PÉREZ – GARNELO, S. S. – GARZÓN SINGLER, A. – MONTORO ANGULO, V. (1996): Sperm characteristic of Manchego ram lambs treated by melatonin implants (Manchego kosbárányok spermatulajdonságai

meletonin implantáció után) – Arcivos de Zootechnica, 45. k. 172.: 395-401.

86. MANN, T. – LUWAK-MANN, C. (1955): Biochemical changes underlying the phenomenon of cold shock in spermatozoa. – Arch. Sci. Biol., 39: 578-588.

87. MANN, T. (1978): Experimental approach to the study of semen and male reproductive function. Int. J. Fertil., 23: 133-7.

88. MARTI, E. – MARA, L. – MARTI, J. I. – MUINO-BLANCO, T. – CEBRIAN-PEREZ, J. A. (2007): Seasonal variations in antioxidant enzyme activity in ram seminal plasma. Teriogenology, 26: 1446-54.

89. MARTI, E. – MARTI, J. I. – MUINO-BLANCO, T. – CEBRIAN-PEREZ, J. A. (2008): Effect of the cryopreservation process on the acitivity and immunization of antioxidant enzymes is ram spermatozoa. Androl, 29: 459-67.

90. MAXWELL (1980): Fertility of ram semen frozen in autumn and spring. Proc. Aust. Soc. Reprod. Biol., 12:8, Abstract.

91. MAXWELL, W. M. C. (1984): Current problems and future potential of artifical insemination programmes. In: D.R. Lindsay and D. T.

Pearce (Editors), *Reproduction in Sheep*. Australian Academy of Science and Australian Wool Corporation, Canberra, pp.291-298.

92. MAXWELL, W. M. C. (1986a): Artificial insemination of ewes with frozen-thawed semen at a synchronised oestrus. I. Effect of time of onset of oestrus, ovulation and insemination on fertility. *Anim. Reprod. Sci.*, 10: 301-308.

93. MAXWELL, W. M. C. (1986b): Artificial insemination of ewes with frozen-thawed semen at a synchronised oestrus. II. Effect of dose of spermatozoa and site of insemination on fertility. *Anim. Reprod. Sci.*, 10: 309-316.

94. MAXWELL, W. M. C. – Barnes, D. R. (1986): Induction of oestrus in ewes using a controlled internal drug release device and PMSG. *J. Agric. Sci.*, 106:201-203.

95. MAXWELL, W. M. C. – BUTLER, L. G. (1984): Fertility of ewes following intra-uterine insemination using a laparoscope compared with other methods. *Proc. Aust. Assoc. Anim. Breed., Genet.*, 4: 192-193.

96. MAXWELL, W. M. C. – BUTLER, L. G. – WILSON, H. R. (1984): Intrauterine insemination of ewes with frozen semen. *J. Agric. Sci.*, 102: 233–235.



97. MAXWELL, W. M. C. - CURNOCK, R. M. – LOGUE, D. N. – REED, H. C. B. (1980): Fertility of ewes following artificial insemination with insemination with semen frozen in pellets or straws, a preliminary report. *Theriogenology*, 14: 83-89.
98. MAXWELL, W. M. C. – SALAMON, S. (1993): Liquid storage of ram semen: a review. *Reprod. Fertil. Dev.* 5, 613-638.
99. MAXWELL, W. M. C. – JOHNSON, L. A. (1997): Membrane status of boar spermatozoa after cooling or cryopreservation. *Theriogenology*, 48: 209-19.
100. MAXWELL, W. M.C. – EVANS, G. – MORTIMER, S. T. – GILLIAN, L. – GELLATLY, C. A. (1999): Normal fertility after insemination with frozen-thawed spermatozoa supplement with seminal plasma. *Reprod. Fertil. Dev.*, 11:123-126.
101. MAXWELL, W. M. C. – DE GRAAF, S. P. – GHAOUI REL, H. – EVANS, G. (2007): Seminal plasma effects on sperm handling and female fertility. – *soc. Reprod. Fertil. Suppl.*, 64: 13-38.
102. MAZUR, P. (1985): Basic concepts in freezing cells. In: Johnson, L. A. – Larsson, K. (Eds.), *Deep Freezing of Boar Semen*. Proc. 1st Int. Conf. Deep Freez. Boar Semen Swedish Univ. Agr. Sciences, Uppsala, pp. 91-111.

103. MCGRADY, A. V. – NELSON, L. – IRELAND, M. (1974): Ionic effect on motility of bull and chimpanzee spermatozoa. *J. Reprod. Fertil.* 40: 71-76.

104. MENGER, M. - BRÜCKNER, G. - NEUBERT, L. (1982): In-vitro und in-vivo-Untersuchen zur Tieftemperatur Konservierung von Schlafbocksperma. *Arch. Exp. Vet. Med.*, 36: 151-157 p.

105. MILOVANOV, V. K. – GOLUBJ, V. S. (1973): Effect of special nutrition of rams on the liquid content of spermatozoa and fertility results after insemination (in Russian). *Zhivotnovodstvo*, 11: 78-80.

106. MIOLVANOV, V. K. – VARNAVSKAJA, V. A. – SHAJDULLIN, I.N. (1985): Medium for deep freezing of semen. *Zhivotnovodstvo*, 7:39-41. (in Russian)

107. MIXNER, J. P. – SAROFF, J. (1954) CIT: GARNER, D.L. (1997): Ancillary test of bull semen quality. *Food Animal Practice*, 13. 313-330.

108. MORTON, B. – HARRIGAN, J. – ALBAGLI, L. – JOOSS, T. (1973): The activation of motility in quiescent hamster sperm from the epididymis. *Biol. Reprod.*, 9: 71-72.

109. MUINO-BLANCO, T. - PEREZ-PE T. – CEBRIAN-PEREZ, J. A. (2008): Seminal plasma proteins and sperm resistance to stress. – *Reprod Domest Anim.*, 43: Suppl. 4:18-31.

110. NAGY (2002): Emlős-spermiumok membránintegritás-vizsgálatai *Állattenyésztés és Takarmányozás*, 51:6. 607.

111. NAUK, V. A. – BORONCHUK, G. V. (1992): Effectiveness of antioxidants in freezing ram semen (in Russian). *Bul. Acad. Stiinte Repub. Moldova Stiinte Biol. Chim.*, No. 1: 43-46.

112. NAUK, V. A. – LANSBERG, E. S. (1972): Synthetic media for preservation of ram semen at -196°C (in Russian). In *Technology of Artificial Insemination and Reproductive Biology of Farm animals*. Kolos, Moscow, pp. 224-228.

113. PÉREZ-PE, R. – CEBRIÁN-PÉREZ, J. A. – MUINO-BLANCO, T. (2001): Semen plasma protein prevent cold-shocks membrane damage to ram spermatozoa *Theriogenology*, 2001 56: 425-434. p.

114. PETERSON, R. M. – RUSSEL, L. – BUNDMAN, D. – FREUND, M. (1978): Effect of ionophore induced calcium uptake and dibutyrycyclic AMP on the acrosome membrane of boar spermatozoa. *Proc. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.*, 37: 380.

115. PETERSON, R. M. – SELVER, D. – BUNDMAN, D. – FREUND, M.(1979): The effect of theophylline and dibutryl cyclic AMP on the uptake of radioactive calcium and phosphate ions by boar and human spermatozoa. *J. Reprod. Fertil.*, 55: 385-390.

116. PLATOV, E. V. (1968): Effect of freezing on the adenosine polyphosphate level of semen in Russian *Ovtsevodstvo*, No. 8: 14-17.

117. PLATOV, E. M. (1977): Study on freezing ram semen in Russian *Ovtsevodstvo* No. 9, 35-37.

118. PLATOV, E. M. (1988): Cryopreservation of ram spermatozoa. *Cryopreservation of Spermatozoa of Farm Animals. Agropromizdat, Leningrad*, pp. 161-195, (in Russian).

119. REMES, E. (1972): the artificial insemination of sheep in Finland. *World Rev. Anim. Prod.*, 8: 73-75.

120. REY, L. R. (1957): Studies on the action of liquid nitrogen on cultures in vitro of fibroblast. *Proc R. Soc. Lond. Ser. B* 147:460-466.

121. ORELLO, M. – CEBRIAN-PEREZ, J. A. – MUINO-BLANCO, T. (1997): Improvement of cryopreserved ram sperm heterogeneity and viability by addition seminal plasma. *J. Androl*, 18: 732-9.

122. PUDRY, P.H. (2006): The post-thaw quality of ram sperm held for 0 to 48 h at 5°C prior to cryopreservation *Animal Reproduction Science*, 93, 1-2:114-123.

123. QUIANTANA CASARES, P. I. – MAXWELL, W. M. C. – WILSON, H. R. – SETCHELL, B. P. (1990): The effect of dose of motile spermatozoa inseminated by intrauterine and cervical inseminations on conception rate. *Proc. Aust. Soc. Reprod. Biol.*, 22: 68. abstack.

124. QUINN, P.J. – WHITE, I.G. (1966): The effect of cold shock and deep-freezing on the concentration of major cations in spermatozoa. *J. Reprod. Fertil.*, 12: 263-270.

125. QUINN, P. J. – WHITE, I. G. – CLEVELAND, K. W. (1969): Chemical and ultrastructural changes in ram spermatozoa after washing, cold shock and freezing. *J. Reprod. Fertil.*, 18: 209-220.

126. QUINN, P.J. – WHITE, I.G. – VOGMAYR., J.K. (1970): Use of continous flow dialysis apparatus to determine the effect of cations, buffers and osmotic pressure on ram spermatozoa. *J. Reprod. Fertil.*, 22: 253-260.

127. REBOLLEDO, A. – SIERRA, L – TAMAYO, A. – LORIA, A. – DENIS, S. – OSES, R. – PARRA, E. – MONSREAL, L. – UGLADE, J. (2007): Fertility in hair sheep inseminated with freeze spermatozoa rediluted

with seminal plasma. *Revista Científica, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad del Zulia*, 17: 73-6.

128. ROSANDA, A. – HICKS, J. J. – MARTINEZ-ZEDILLO, G. – BONDANI, A. – MARTINEZ-MANATOU, J. (1970): Inhibition of human sperm motility by calcium and inc ions. *Concentration*, 2: 259-273.

129. SALAMON, S. (1968): Deep freezing of ram semen: recovery of spermatozoa after pelleting and comparison with other metghods. *Aust. J. Biol Sci.* 21, 355-360.

130. SALAMON, S. (1972): Fertility of ram spermatozoa frozen-stored for three years. *Proc. 7th Int. Congr. Anim. Reporod. A. I., Munich* vol 2 pp. 1493-1495. Salamon, S. (1976): *Artifical Insemination of Sheep*. Publicity Press, Chippendale, N. S. W., 104 pp.

131. SALAMON, S. – LIGHTFOOT, R. J. (1969): Freezing of ram spermatozoa by the pellet method. I. The effect of diluent composition on survival of spermatozoa. *Aust. J. Biol. Sci.* 22, 1527-1546.

132. SALAMON, S. – VISSER D. (1972): effect of composition of tris-based diluent and of thawing solution on survival of ram spermatozoa frozen by the pellet method. *Aust. J. Biol. Sci.* 25, 6058-618.

133. SALAMON, S. – MAXWELL, W. M.C. (2000): Storage of ram semen. *Animal Reproduction Science*, 62: 77-111.

134. SALAMON S.- MAXWELL W. M. C. (1997/a): Frozen storage of ram semen I. Processing, freezing, thawing and fertility after cervical insemination – *Animal Reproduction Science*, 37: 185-249.
135. SALAMON, S. – MAXWELL, W. M. C. (1997/b): Frozen storage of ram semen II. Courses of loww fertility after cervical insemination methods of improvement. *Anim. Reprod.*
136. SHAMS-BORHAN, G. – HARRISON, R. A. P. (1981): Production, characterization and use of ionophore-included calcium-dependent acrosome reaction in ram sperm. *Gamete Res.*, 4: 407-432.
137. SIMSON, A. M. – WHITE, I.G. (1986): Effect of cold-shock and cooling rate on calcium uptake of ram spermatozoa. *Animal Reproduction Science*, 12. 132-143.
138. SMIRNOV, I.V. (1949): Storage of semen of farm animals by deep-freezing. (in Russian) *Sov. Zootech.*4, 63-65
139. SMIRNOV, I. V.(1950): Deep freezing of semen of farm animals. (in Russian) *Zh. Obshch. Biol.* 3, 185-197.
140. SZABADOS, T. – GERGÁTZ, E.- VITINGER, E. – TASI, ZS.- GYÖKÉR, E. (2005): Lambing rate as a functionof artifical insemination depth in ewe lambs, primiparous and multiparous ewes. *Acta Agraris Kaposváriensis*, 9. 41-49 p.

141. SZABADOS, T – GERGÁTZ, E. – GYÖKÉR, E. – CSIBA, A. – GYIMÓTHY, G, - NÉMETH, A.- MIHÁLYFI, S. (2008): A külső méhszáj alakulások és a termékenyítő katéter bejuttathatóságának vizsgálata laccaune juhállományban – Állattenyésztés és Takarmányozás, 57. 1. 55-64. p.

142. TÖRŐ I. (szerk) (1989): Az élet alapjai Gondolat Kiadó, Budapest

143. VANDENMARK, N. L. – ESTERGREEN, V.L. – SCHORR, R. – KUHLMANN, D.E. (1995) CIT: GARNER, D.L. – PINKEL, D. – JOHNSON, L. A. – PACE, M. N. (1986): Assessment of spermatozoa function using dual fluorescent staining and flow cytometric analyses. Biol. Reprod., 34. 127-138.

144. VARNAVSKIJ, A. N. – TURBIN, V.F. (1974): Some results of studies on freezing ram semen (in Russian). Zhivotnovodstvo, 6. 65-67.

145. VARNAVSKIJ, A. N. – VARNAVSKAJA, V. A. (1976): Results of artificial insemination with frozen semen. (in Russian). Ovtsevodstvo 9, 19-20.

146. VEKSLER-HESS, J. D. ÉS CISALE, H. (1992): Cervix ovina: Selektion de madres para IA con semen congelado. Vet. Argentina, 9. 90. 680-685 p.



147. VISSER, D. – SALAMON, S. (1974a): Fertility following insemination with frozen-thawed reconcentrated and unconcentrated ram semen. *Aust. J. Biol. Sci.* 27, 423-425.

148. VISSER, D. – SALAMON, S. (1974b): The effect of pellet volume, dilution rates preezing and at thawing and of thawing temperature on the survival and acrosome morphology of frozen ram spermatozoa. *S. Afr. J. Anim. Sci.*, 4, 147-155.

149. VISSER, D. – SALAMON, S. (1974c): The effect of freezing method on the survival of ram spermatozoa. *S. Afr. J. Anim. Sci.*, 4, 157-163.

150. VOLKOV, A. S. (1968): Conception in ewes inseminated with deep frozen semen (in Russian). *Sb. Nauchyn. Rab. Vses. Ord. Tr. Krasnodar. Znem. Nauchno. Issled. Inst. Zhivotn.* 10:74.

151. WALES, R. G. – WHITE, I.G. (1959): The susceptibility of spermatozoa to temperature shock. *J. Endocitrol*, 19: 211-220.

152. WANG, L. – ZENG, P. – FEN, K. (1981): Studies of the improvement of frozen ram semen (in Mandarin). *Acta Vet. Zootechn. Sin.*, 12: 251-258.

153. WATSON - MARTIN (1974): Regions of the freezing curve causing changes in structure and viability of ram sperm *Nature*, 251: 315-316.

154. WATSON, P. F. (1995): Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thaw function. *Reprod. Fert. Dev. Vol.*, 871-891.

155. ZHELTOBRJUK, N. A. – IVAKHNENKO, V. K. – AJBASOV, M.M. (1981): Freezing of ram semen in dextran containing diluents. *Breeding of Sheep and Goats and Wool Production, Stavropol*, pp. 56-60, (in Russian)

156. ZOMBORSZKYNÉ (2000): Anyajuhok tartása és takarmányozása In: Horn Péter (2000): szarvasmarha, juh, ló –Mezőgazda Kiadó, Budapest 413-414 p.