

(11) **CSIBA A.¹, GERGÁTZ E.²**

Kosperma mélyhűtés módszereinek összefoglaló vizsgálata

Comparative examination of ram semen freezing methods

csiba.anita@gmgi.hu

¹ VM Mezőgazdasági Gépesítési Intézet, intézeti mérnök

² Pharmagene Farm Kft., Biotechnikai Állomás NYME-MÉK, ny. egyetemi tanár

Abstract

A termékenyítésre szánt mélyhűtött kosperma minőségének különböző eljárásokkal történő ellenőrzése, illetve a mélyhűtési technológia optimalizálása a mélyhűtött szaporítóanyag előállítása során nagyon fontos feladat. Vizsgálataink során a szaporítóanyag mélyhűtési és visszaolvasztási eljárás különböző fázisaiban végzett ellenőrzése mellett az inkubációs kísérletek eredményeit elemeztük, sőt összehasonlítottuk a szakirodalomban már korábban publikált hasonló témakörben született eredményekkel. A fázisvizsgálatok tárgya jelen esetben a hűtési sebesség a szakaszos mélyhűtés során, a különböző hígító oldatok használata, illetve különböző összetételű visszamelegítő oldatokban állandó hőmérsékleten végzett inkubáció volt.

Irodalmi áttekintés

A kosperma mélyhűtés módszertanának témakörén belül a mélyhűtésre való előkészítésen keresztül a szakaszos hűtésen át a mélyhűtési módszer alkalmazásával, dekapacitációval, inkubálással kapcsolatos tapasztalatokról már számos kutató publikált.

Előkészítés, mélyhűtés módszere témakörben az általunk használt módszerhez hasonló szakirodalomból kiragadott eredmények az alábbiak

Salamon és Maxwell (1994/a, b) két cikkükben összefoglalták a mélyhűtött kospermával foglalkozó kutatók hígítási és mélyhűtési módszereit, valamint termékenyítési eredményeit. Az általunk használt hígítókhöz Colas és Brice (1976) 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, tojássárgája mellett 4 % glicerint is tartalmazott. Ez utóbbit krioprotektív anyagként használták. 4 °C-on adták hozzá a II-es hígítót. Hígítási aránynak 1:4 –es arányt ajánl Brice (1975). Kísérleteink során mi is ehhez hasonló 1:5-höz hígítási arányt alkalmaztunk. (A hígítási arány azonban a különböző sűrűségű ejakulátumok esetében eltérő volt.)

Maxwell (1980) viszont eltérő összetételű hígítót alkalmazott, azonban a mélyhűtés módszereként az általunk is használt pelletben történő mélyhűtést alkalmazta. A termékenyítőanyag minőségének meghatározását Colas and Brice (1975), illetve Maxwell (1980) egyaránt termékenyítési kísérletekkel ellenőrizte. A termékenyítési eredmények közül a 60% -os eredmény már megfelelőnek tekinthető.

Forrás	Hígító	Mélyhűtés módja	Termékenyítő képesség	
			tavasszal vett sperma	összettel vett sperma
Colas and Brice (1975)	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			48,45%	47,25%

Salamon és Maxwell (1994/a) szerint a hűtési sebesség a megfelelő a sejtplazma glicerol koncentrációjának beállításához szükséges.

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

Az ezzel a témával foglalkozó legtöbb kutató Feredean és Bragan (1964), Colas (1975), Graham és munkatársai (1978), Fisher és Fairfull (1989) és Menger (1982) a 4-5 °C-on való hozzáadást találta a legoptimálisabbnak, 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 történő hozzáadás a legoptimálisabb.

Colas és Brice (1975) szerint a termékenyítési eredmények jobbak lettek a glicerolt tartalmazó hígító 4 °C-on történő hozzáadása esetében, mint a 30°C-on hozzáadott gliceroltartalmú hígítóval kezelt minták esetében.

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

Salamon és Maxwell (1994/a) több kutató vizsgálati eredményeinek tanulmányozásából levont következtetések alapján magasabb hűtési sebességnél, alacsonyabb glicerol koncentrációt ajánl.

Salamon és Maxwell (1994/a) cikkében összefoglalt kutatási eredmények alapján a legmagasabb élősejtszámot akkor tapasztalta a visszamelegítés után, ha 4-5%-os glicerol koncentrációjú hígítót használtak, a hűtési sebesség pedig 1-100 °C min⁻¹ között volt.

P. H. 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, azonban az általa végzett 24 -, illetve 48 órás időtartam túl hosszú inkubációs időszak a mélyhűtés előtt. P.H Pudry (2006) Maxwellhez (1980), illetve Colas és Bricehoz hasonlóan (1976) szintén külön-külön vizsgálta az őszi, illetve tavaszi szaporítóanyagok közti különbséget.

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 inkubálva a mélyhűtés pelletálás 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

Lopez és 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 adatok azonban az általuk publikált vizsgálatok között nem szerepelnek.

López-Brea et. al. (1996)			
kezelés	Élősejtszám (%)	Érintetlen acrosoma „F ²² + ²² B” kategória (%)	Akroszóma -reakción átesett „AR” kategória (%)
melatoninnal implantált sejtek esetében	80,9	84,3	15,7
kontrol	80,1	79,1	20,9

Szakirodalomban megtalálható mélyhűtés utáni visszaolvasztás, illetve hőkérimertő próba végzése során kapott eredmények

M. C. Gomez és munkatársai (1997) 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.

M. C Gómez et. al. (1997) szerint:									
Kategóriák	Frissen vett hígított	inkubált							
		30°C				39°C			
	inkubálás előtt	0,5 h	1 h	4 h	19 h	0,5 h	1 h	4 h	19 h
Akroszóma-reakción átesett sejtek aránya "AR" (%)	16	28	22	36	48	34,5	39	40,5	57,5
Kategóriák	Mélyhűtött-visszamelegített	inkubált							
		30°C				39°C			
	inkubálás előtt	0,5 h	1 h	4 h	19 h	0,5 h	1 h	4 h	19 h
Akroszóma-reakción átesett sejtek aránya "AR" (%)	33	64	53,5	46	51	54,5	59,5	60,5	64,5

Gillian és munkatársai (1997) inkubációs kísérleteik során az alábbi eredményeket kapták. Ők már vizsgálták a kapacitációszerű elváltozáson, illetve akroszóma-reakción átesett sejtek arányát, azonban az alábbiakban látható, hogy adatsoraik nem teljeseek.

Gillian et. al. (1997) szerint:				
Kategóriák	Frissen vett hígított	37°C-on, 6h-ig inkubált	Mélyhűtött-visszamelegített	37°C-on, 6 h-ig 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 pelletált: 51,4% -140°C-on pelletált: 52,1%	

Gillian és munkatársai (1997) a mélyhűtött, illetve inkubált szaporító anyaggal termékenyítéseket is végeztek. 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 et.al. (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

Anyag és módszer

Mélyhűtésre történő előkészítés és mélyhűtési eljárás

2007-2009 között végzett vizsgálataink 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 végeztük el. A vizsgálatokat mélyhűtésre való előkészítés, több fázisú hígítás, szakaszos hűtés, illetve PBS foszfátpuffert tartalmazó oldatban, valamint dekapacitáló faktorokat tartalmazó oldatokban történő visszamelgítés során végeztük. A dekapacitáló faktorokat tartalmazó oldatok a PBS-en kívül spermaplazmát, illetve különböző anyajuhok és kosok vérsavóját tartalmazták. A különböző tenyészkosok mélyhűtés után

visszamelegített, illetve a kosok átlagos 39 °C-on, 2 órán keresztül inkubált mintáinak esetében nagyon eltérő eredményeket kaptunk a különböző dekapacitáló faktortokat tartalmazó oldatok esetében. Ennek oka valószínűleg a dekapacitáló faktorokat tartalmazó oldatokban jelenlévő kapacitációban, illetve akroszóma-reakcióban szerepet játszó ionok koncentrációja, hormontartalma, zsírsav- és aminosav összetétele lehet.

A mélyhűtésre való előkészítés módszerénél fontos lehet a hígító összetételének meghatározása, különösen a krioprotektív anyag minősége, mennyisége és hozzáadása, az előkészítés és mélyhűtés szakaszainak meghatározása, az egyensúlytadási idő, a hűtési sebesség, illetve a visszamelegítő oldatok összetétele.

A mélyhűtésre való előkészítés mélyhűtés, illetve visszamelegítés módszerének alkalmazása sok éves tapasztalat és munka eredménye. A fenti irodalmi áttekintésben rövid összefoglaló látható a különböző szerzők által alkalmazott, majd publikált előkészítésre, mélyhűtésre és visszaolvasztásra alkalmazott módszerei, valamint egyes esetekben a hozzájuk tartozó eredményekre vonatkozóan is. A fentiekből látható, hogy sok megválaszolatlan kérdés és számos lehetőség merül még fel e témával kapcsolatban, melyekre a vizsgálataink folytatásával tovább keressük a válaszokat.

A vizsgálatok során használt módszerek az alábbiak:

Hígítás módszere

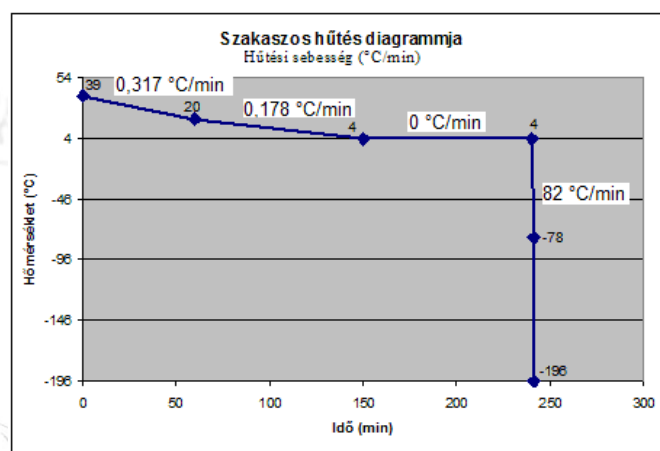
-I. hígító: laktóz- tojássárgája

-II. hígító: laktóz-tojássárgája-analitikai tisztaságú glicerín (glicerines hígító hozzáadása 4 °C-on történik, szakaszos adagolással)

Előkészítés és szakaszos hűtés fázisai

- Testhőmérsékleten hígítás I-es hígítóval
- 20 °C-ra hűtés 1 óra alatt
- 4 °C-ra hűtés 1,5 óra alatt
- II-es hígító hozzáadása
- Equilibrálás (1-2 óra)
- Pelletizálás szárazjégen
- Folyékony N₂-be helyezés

Hűtési sebesség



LIV.

GEORGIKON NAPOK

54th Georgikon Scientific Conference

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

Visszamelegítő oldatok összetétele

- PBS oldatban
- PBS + spermaplazma (dekapacitáló faktorokat tartalmaz)
- PBS + különböző állatok anyajuhok, illetve a vizsgálatban részt vevő tenyészkosok vérsavója (dekapacitáló faktorokat tartalmaz)

Az előkészítés, hűtés és mélyhűtés és visszaolvasztás, illetve a testhőmérsékleten történő inkubálás következtében a szaporítóanyagban végbemenő minőségi változások különböző vizsgálati eljárásokkal történő ellenőrzése

Ejakulátum mennyiségének meghatározása

A mélyhűtésre való előkészítés során a hozzáadandó hígító mennyisége a levett ejakulátum mennyiségétől és sűrűségétől függ.

Fénymikroszkópos eljárással a szaporítóanyag alábbi paramétereit ellenőrizhetők

- Nyers sperma motilitása (1M-5M): frissen vett szaporító anyagból. A mintavételt követően végeztük. Kizárólag annak meghatározására szolgált, hogy az adott minta alkalmas-e felhasználásra, mélyhűtésre.
- Sűrűsége (1S-5S): meghatározása frissen vett szaporítóanyagból történt. Annak meghatározására szolgált, hogy az adott minta alkalmas-e felhasználásra, mélyhűtésre, illetve a hígítás arányának meghatározása szempontjából is fontos.
- Hígított sperma élősejtszáma (%): hígítás-, illetve mélyhűtés után visszaolvasztott, valamint 39 °C és 2 órán át tartó inkubációt követően végeztük.

CTC fluoreszcens festési eljárással meghatározható a dekapacitáció mértéke

Gillian és munkatársai által 1997-ben publikált CTC fluoreszcens festési eljárást alkalmaztuk a kos sperma kapacitációs állapotának meghatározására. 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 egy visszafordíthatatlan folyamat. Természetesen a két folyamat elengedhetetlenül szükséges a megtermékenyítéshez, de fontos, hogy azok megfelelő helyen és időben történjenek.

A kapacitáció és az akroszóma-reakció szerepe a megtermékenyítés folyamatában Dobozy, 2007 szerint:

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. un. 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)

Akroszóma-reakció

A zona pellucida ZP3 molekulája (az un. 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. A spermiumnak a ZP3-hoz való kötődése váltja ki. A kapcsolat hatására a spermium sejten belüli Ca^{2+} -koncentrációja megnő (a Ca^{2+} -ionok részben a sejten belüli raktárakból szabadulnak fel, részben pedig az extracelluláris térből áramlanak a sejtbe). A 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 glikoproteinjéhez. Ez a kapcsolat előfeltétele a petesejt és a spermium plazmamembránja közötti fúciónak. (Dobozy, 2007.)

A hígított sperma mélyhűtésre való előkészítés, illetve szakaszos mélyhűtés közben, valamint a visszaolvasztás után a spermiumsejtek membránjának vizsgálata, a kapacitáción és akroszóma-reakción átesett sejtek arányának meghatározását végeztük el. A CTC fluoreszcens festési eljárás eredményeinek értékelése során meghatározható a dekapacitáció mértéke, melynek vizsgálatát a különböző dekapacitáló faktorokat tartalmazó visszamelegítő oldatok dekapacitáló hatását az egyes tenyészkosok szaporítóanyagának mintáira vizsgáltuk.

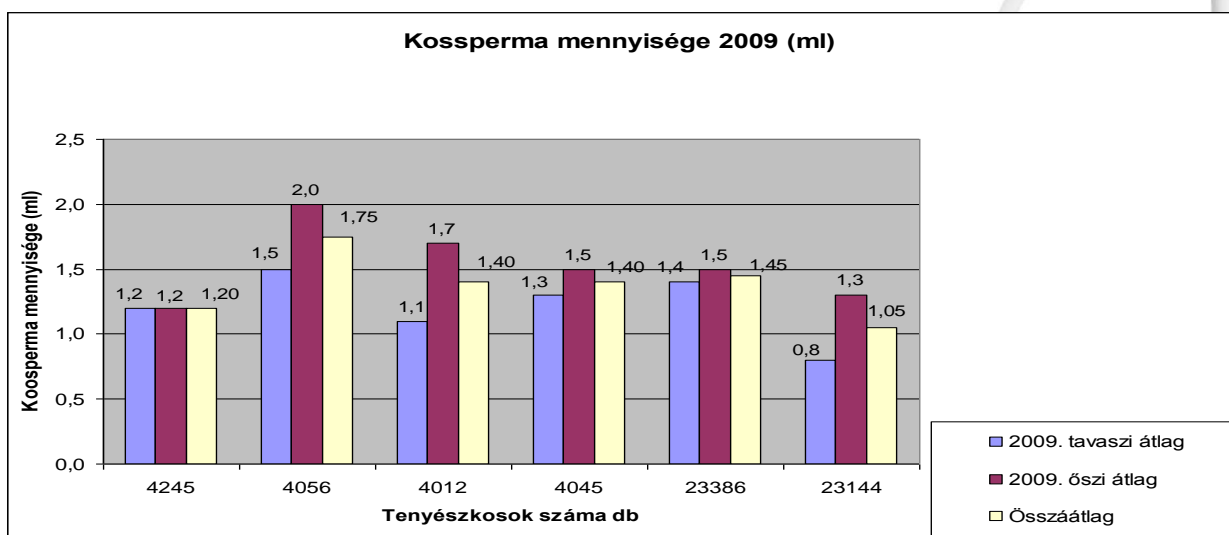
A fénymikroszkópos és CTC fluoreszcens festési eljárás egymást kiegészítve kiváló módszer a szaporítóanyag termékenyítőképességének meghatározására, mivel az elősejtszámról, a sejtek mozgásképességéről, illetve a sejtmembrán, valamint az akroszóma állapotáról ad képet, melyek együttesen felelnek a termékenyítőképességért. Ezen vizsgálati módszerek kiváló kiegészítője még a felolvasztás után testhőmérsékleten végzett inkubáció, az úgynevezett hőkimerítő próba. Az inkubációs kísérletet legcélszerűbb az állatok testhőmérsékletének megfelelő, jelen esetben 39 °C-os vízfürdőben végezni. A kísérletek során szerzett tapasztalatok szerint a nem természetes környezet hatására a spermiumsejtek hamar elpusztulnak. Az inkubációs idő így jelen esetben 2 óra volt. Az inkubációt a PBS-t, illetve különböző dekapacitáló faktorokat tartalmazó anyagokba helyezett mélyhűtés után visszamelegített minták esetében végeztük el.

Eredmények

Kosperma mennyisége 2009-es eredmények

Már a 2007-2008-ban végzett vizsgálatok eredményei alapján is megállapítható volt, hogy a tenyészkosoktól a főszезon, azaz őszi folyamán vett minták mennyisége több a tavasziénál. Az őszi minták minősége a három év adatai alapján szintén jobbnak az előzőnél.

Kosperma 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	2,0	1,7	1,5	1,5	1,3
Átlag	1,2	1,6	1,3	1,4	1,5	1,0



Élősejtszám 2009-es eredmények

LIV. GEORGIKON NAPOK

54th Georgikon Scientific Conference

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.

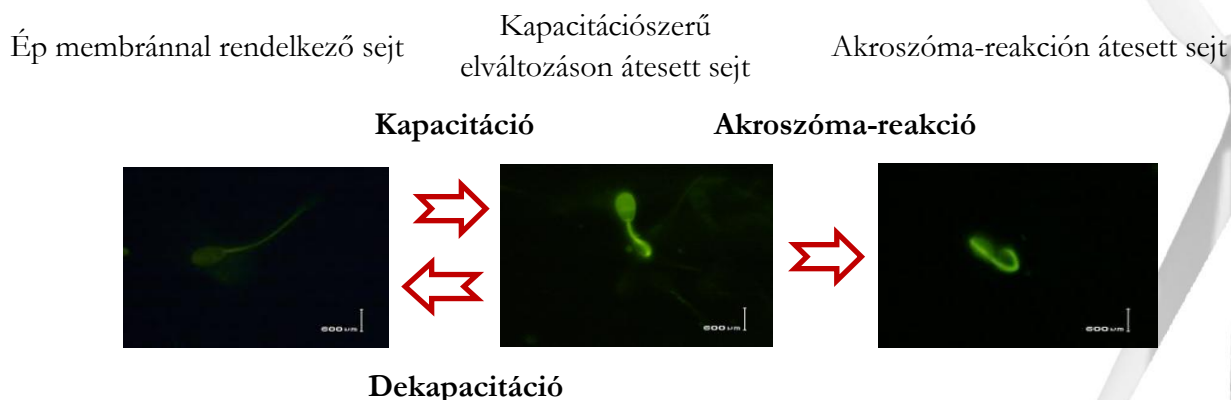
Dekapacitáló faktorok élősejtszámra gyakorolt hatása 2009-es minták esetében (Átlageredmények alapján)						
Dekapacitáló faktorokat tartalmazó oldatok	Élősejtszám a különböző vizsgált állatok mintái esetében (%)					
	4245	4056	4012	4045	23386	23144
Élősejtszám testhőm.-en	68%	69%	68%	65%	58%	60%
PBS	23%	19%	18%	23%	15%	25%
PBS + spl.	23%	22% (3%)	13%	38% (15%)	23% (8%)	30% (5%)
PBS + vs. (8181)	16%	9%	0%	Na.	25% (10%)	Na.
PBS + vs. (4245)	18%	15%	0%	Na.	20% (5%)	Na.
PBS + vs. (4056)	20%	20% (1%)	16%	30% (7%)	20% (5%)	20%
PBS + vs. (4012)	20%	10%	1,50%	32,5% (9,5%)	32,5% (17,5%)	Na.
PBS + vs. (8211)	18%	14,38%	0%	Na.	15%	Na.

Értéklés	Átlag eredmények javultak (%)
	10% - 20%
	5% - 9,9 %
	1%-4,9%

Dekapacitáció mértéke

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.

Kapacitációszerű elváltozás, dekapacitáció és akroszóma-reakció modellezése



A különböző kategóriákba tartozó sejtek számának változása a kapacitációszerű elváltozás, dekapacitáció és akroszóma-reakció hatására

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

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.

Különböző dekapacitáló faktorokat tartalmazó oldatok hatása a vizsgált csoportba tartozó kosok mélyhűtött szaporító anyagának dekapacitációjára a visszamelegítést követően						
Dekapacitáló faktorokat tartalmazó oldatok	Különböző állatoktól származó mélyhűtött minták esetében elért dekapacitáció a felolvasztás után (%)					
	4245	4056	4012	4045	23386	23144
PBS (kontrol minta)	0%	0%	0%	0%	0%	0%
PBS + spl.	1,50%	20%	26%	8%	24%	0%
	23%	29%	22%	5,50%	20%	
	21%	6%				
	2%					
	15%					
PBS + vs. (8181)	20,50%	40%	9,50%		23%	0%
	9,50%		6,50%			
PBS + vs. (4245)	19%	2,50%	20%		22%	0%
	0,50%	29%	2,50%			
	19,50%					
	16,50%					
	4%					
PBS + vs. (4056)	2%	6%	13%		11,50%	0%
	21%	12%	22%		6,50%	
	2,50%					
	4%					
	16,50%					

	1%					
PBS + vs. (4012)	12,50%	14%	5,50%			0%
	24%	31,50%	17%			
	7%					
	7%					
PBS + vs. (8211)	40%	7,50%	7,50%	5,50%	4%	0%
		39,50%	10,50%			

Jelmagyarázat	20%<
	15%<
	10%<
	5%<
	5%>
	0%

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 szórást mutat. A megfelelő vérsavó használatával azonban jelentősen növelhető a dekapacitáló oldatok hatékonysága. Gyakorlatban történő felhasználásuk az adott telepen történő előzetesen elvégzett „keresztpróbák” alapján végezhető. A dekapacitáló oldatokhoz érdemes az összes használatban lévő tenyészkostól és több anyajuhtól vett vérmintából vérsavót készíteni és előzetes próbákat végezni. Ezzel növelhető a különböző állatok visszamelegített szaporító anyagához készített visszamelegítő oldatok dekapacitáló hatása.

A továbbiakban érdemes lenne laboratóriumban analizálni a vérsavók összetételét, különösen a HCO_3^- és a Ca^{2+} ion koncentrációját, mivel ezen ionok játszanak fontos szerepet a kapacitáció és akroszóma-reakció során. Ezen kívül az oldatok zsírsav, illetve aminosav összetétele is rendkívül fontos lehet.

Inkubációs kísérletek eredménye 2009

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.

Hőkimerítő próba során végzett élősejtszám változásának vizsgálata a különböző dekapacitáló faktorokat tartalmazó oldatokban							
Fázisok	Visszamelegítő oldatok	Kosok száma					
		4245		4056		23386	
Mélyhűtés előtti hígítás	Krioprotektív anyagot nem tartalmazó hígítóban (I.-es hígító)	70%		70%		70%	
Visszamelegítés után	Hőkimerítő próba	előtt	után	előtt	után	előtt	után
	PBS oldatban	25%	20%	30%	20%	20%	12,5%
	PBS+ spermaplazmában	30%	25%	35%	27,5%	25%	5%
	PBS + vérsavóban (8181)	10%	5%	25%	7,5%	7,5%	2%
	PBS + vérsavóban (4245)	25%	22,5%	30%	27,5%	30%	22,5%
	PBS + vérsavóban (4056)	32,5%	17,5%	15%	15%	20%	10%
	PBS + vérsavóban (4012)	30%	10%	25%	1,5%	32,5%	22,5%
	PBS + vérsavóban (8211)	20%	12,5%	17,5%	10%	17,5%	15%

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 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 - (Ca^{2+} , 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 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 termékenyítő anyag termékenyítésre való alkalmasság vizsgálati módszerének továbbfejlesztéséhez is.

Irodalomjegyzék

- BLACKSHAW (1960/a): The effects of pH and the temperature of glycerolization on the revival of ram and bull spermatozoa after freezing to $-79\text{ }^{\circ}\text{C}$ – Aust. Vet. J., 36: 376-379p.
- BLACKSHAW (1960/b): The effects of milk diluents on the viability of ram spermatozoa and their revival after freezing. – Aust. Vet. J., 432-435p.
- 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.
- COLAS, G. AND BRICE, G.(1975): Etude des principaux facteurs de survie et de fécondance du sperme de belier apres congélation.- Ceres, 2: 253-260 p.
- DOBOZI O. (2007): A megtermékenyítés – Semmelweis Egyetem Genetikai, sejt- és immunbiológiai Intézetében 2007. február 7-én elhangzott előadás
- FEREDEAN, T. AND BRAGARU, FL. (1964): Studies on conservation of ram semen by freezing to $-79\text{ }^{\circ}\text{C}$ (in Rumanian). Lucr. Stiint. Inst. Cercet. Zootech., 21: 375-368p.
- 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.
- GERGÁTZ E.(2007): Juhok mesterséges termékenyítése című fejezet In: Pécsi Tamás: Házi emlősállatok mesterséges termékenyítése Mezőgazda Kiadó Budapest 2007.
- GILLAN, L.- EVANS, G.- MAXWELL W.M.C. (1997): Capatitation status and fertility of fresh and frozen-thawed ram spermatozoa Capatitation Fertil. Dev., 1997. 9. 481-7 p.
- GOMEZ, M.C. 81997): Effect of culture incubation and acrosome reaction of fresh and frozen-thawed ram spermatozoa for in vitro fertilization and intracytoplasmatic sperm injection – Reprod. Fertil. Dev., 1997, 9, 665-73 p.
- GRAHAM, E.F., CRABO, B.G. AND PACE, M.M.(1978): Current status of semen preservation in the ram, boar, and stallion. – J. Anim. Sci., 47 (Suppl. 2): 80-119 p.
- LÓPEZ, BREA, G. – PÉREZ-GUZMÁN PALOMARES, M.D: - PÉREZ-GARNELO, S.S. – GARZÓN SINGLER, A: - MONTORO ANGULO, V (1996): Sperm characteristics of Manchego ram lambs treated by melatonin implants – Archivos de Zootechnica. 1996.45.k.172.sz. 395-401 p.
- MAXWELL, W.M.C. (1980): Fertility of ram semen frozen in autumn and spring. Proc. Aust. Soc. Reprod. Biol. 12:8, abstract
- MENGER, M. , BRÜCKNER, G. AND NEUBERT, L. (1982): In-vitro und in-vivo-Untersuchen zur Tieftemperatur Konservierung von Schlafbocksperma. – Arch. Exp. Vet. Med., 36: 151-157 p.
- PUDRY, P. H. (2006): The post-thaw quality of ram sperm held for 0 to 48 h at $5\text{ }^{\circ}\text{C}$ prior the cryopreservation Animal Reprod. Science Volume 93, Issues 1-2., June 2006, 114-123 p.
- SALAMON S.- MAXWELL W.M.C.(1994): Frozen storage of ram semen I. Processing, freezing, thawing and fertility after cervical insemination – Animal Reproduction Science 37 (1995) 185 - 249p.
- SALAMON, S. és MAXWELL, W.M.C. (1994): Frozen storage of ram semen II. Causes of low fertility after cervical insemination methods os improvement. Anim. Reprod. Sci. In press
- WATSON és MARTIN (1974): Regions of the freezing curve causing changes in structure and viability of ram sperm Nature, 251: 315-316.

LIV.

GEORGIKON NAPOK

54th Georgikon Scientific Conference