

DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

**KAPOSVÁRI EGYETEM
ÁLLATTUDOMÁNYI KAR**

Nagyállat-tenyésztési és Termelés technológiai Tanszék

A doktori iskola vezetője:

Dr. HORN PÉTER

MTA rendes tagja

Témavezető:

DR. STEFLER JÓZSEF

mezőgazdaság tudományok kandidátusa

Társtémavezető:

DR. KOVÁCS ANDRÁS

MTA doktora

A FRISS ÉS MÉLYHÚTOTT MÉNSPERMA MINŐSÍTÉSÉNEK FEJLESZTÉSE, A SPERMA MINŐSÉGÉT BEFOLYÁSOLÓ TÉNYEZŐK VIZSGÁLATA EGY ÚJ BÍRÁLATI MÓDSZER ALKALMAZÁSÁVAL

Készítette:

DR. KÚTVÖLGYI GABRIELLA

KAPOSVÁR

2012

1. A Kutatás előzményei

A ló már évezredek óta szoros kapcsolatban áll az emberrel. Az utóbbi évtizedekben világszerte fokozódott a mesterséges termékenyítés alkalmazása, mely a természetes fedeztetéssel összehasonlítva számos előnyt kínál. Újabban, a világon évente hűtött, illetve mélyhűtött spermával végrehajtott mesterséges termékenyítések (MT) száma elérte a félmilliót, amelyből százezret végeztek mélyhűtött termékenyítő anyaggal. A sikeres mesterséges termékenyítésekből évente mintegy 350 ezer csikó születik (Central European Management Intelligence /CEMI/ adat, 2006). A mélyhűtött sperma a hűtve-szállítottéhoz képest további előnyöket kínál. A tenyésztésben elért kiemelkedő fontossága ellenére a ménsperma mélyhűtése még nem tekinthető kidolgozott technológiának. Számos módosítást javasoltak az elmúlt években, de mindennek ellenére nagyszámú mén szolgálat gyenge laboratóriumi minőségű és fertilitású spermát a mélyhűtés után. Csupán a mének 30–40%-a termel fagyasztásra tartósan alkalmas ejakulátumot és a ló fajták között is jelentős mélyhűthetőségi eltéréseket figyeltek meg. A spermiumok több mint 50%-a károsodik a mélyhűtés folyamán. A friss és hűtött sperma minősége alapján nem lehet egyértelműen következtetni a mélyhűtést követő spermaminőségre. A ménsperma fagyaszthatósága egyedi jelleget mutat. A friss ondó minőségétől függetlenül a mének spermái eltérő érzékenységet mutatnak a hígítás, a mélyhűtés és a felolvasztás során bekövetkező stresszhatások iránt. A sejtmembrán strukturális változásai és sérülései fontos tényezőnek tűnnek a mélyhűtött ondósejtek csökkent fertilitása szempontjából.

Sok értékes mén termel gyenge minőségű spermát, beleértve a rossz mélyhűthetőséget, az alacsony spermiumszámot és az élő sejtek alacsony arányát. Néhány kimagasló értékű mén esetében korlátozott a sperma elérhetősége, ha hirtelen elhullás, betegség, vagy más okból már nem lehet tőlük többé spermát nyerni. Ezekben az esetekben a spermiumokat in vitro termékenyítésre lehet használni az ondósejt petesejtbe történő injektálása által (intracytoplasmic sperm injection /ICSI/ technikával). Az in vitro termékenyítési technikák mozgó, normális morfológiájú, érett, élő, funkcionális szempontból intakt ondósejtek kiválasztását igénylik. A standard ondósejt szeparálási technikák nem mindig hatékonyak a kis térfogatú, ill. kevés élő sejt számú minták esetében. A spermium-szeparáció hatékonyságának fokozása általában két irányban történhet. Az egyik az elkülönítési módszerek metodikai fejlesztése, illetve újak kidolgozása, a másik, kémiai stimulátorok alkalmazása a funkcionálisan ép ondósejtek kinyerésének, és a spermiumok

termékenyítőképességének fokozására. A hialuronsavat (Hyaluronic acid, HA) sikeresen alkalmazták swim-up (SU) technikával kombinálva. humán in vitro laboratóriumokban a pentoxifillint (PX) széles körbe alkalmazták az immotilis here-, vagy mellékhere-spermiumok mozgásának beindítására. A PX-kezelés felolvasztás után a ménspermiumok motilitását is javította.

A spermiumok értékelésére a különböző módszerek széles palettája ismeretes. Az utóbbi évtizedekben számos laboratóriumi tesztet fejlesztettek ki az ondósejtek funkcionális vizsgálataira. Ezek közé tartoznak a motilitási paraméterek, a kapacitáció, a spontán és indukált akroszóma-reakció, nukleáris és mitokondriális DNS vizsgálati módszerei, de csak kevés került be a rutin klinikai alkalmazásba. A hagyományos spermabírálat erősen szubjektív, főként a sperma sűrűségén és a sejtek motilitásán alapul. Korlátaik ellenére a motilitás és a progresszív motilitás a leggyakrabban értékelt paraméterek a ménsperma értékelésében úgy a laboratóriumokban, mint a ménesekben, mivel a leginkább hozzáférhetőek és gyorsan elvégezhetőek. A legtöbb kísérletben egyetlen változó vizsgálata nem adott megfelelő magyarázatot az egyes ménnek eltérő fertilitására. Ezzel szemben a különböző mutatók vizsgálati eredményeinek együttes értékelése fokozta a termékenyítőképesség előrejelzésének pontosságát. A rutin-értékelés mellett több teszt kombinációja szükség a ménsperma minőségének és termékenyítőképességének megítéléséhez. Multiparaméteres spermaanalízissel felismerhetővé válhatnak a terméketlen és szubfertilis ménnek és fény derülhet a vemhesülési eredmények csökkenésének okaira. A komplex értékelési módszerekkel a különböző mélyhűtési, illetve spermium-szeparálási protokollok is összehasonlíthatók.

A fluoreszcens festések és az áramlási sejtanalízis (flow citometria) újabb hatékony eszközöket szolgáltatnak a kutatóknak és a klinikusoknak több ondósejt-tulajdonság értékeléséhez. Ezekkel az eljárásokkal az ondósejtek élő/elhalt státusza, akroszóma- és mitokondrium-állapota, DNS épsége, és a kapacitáció stádiuma is értékelhető. Előnye, hogy igen nagy sejtszám értékelése lehetséges rövid időn belül. Kombinált fluoreszcens festési technikákat is kidolgoztak a flow-citometeres értékeléshez, de sajnos az áramlásos citométer és gyakran még a fluoreszcens mikroszkóp sem áll a rutin munkában dolgozók rendelkezésére. Ezeknél a technikáknál az is gondot okoz, hogy általában időigényes a minták előkészítése, különböző mosási, tisztítási folyamatok és rövidebb-hosszabb, fluoreszcens festékekkel történő inkubációt igényelnek. A ménspermiumok érzékenyek a hosszadalmas spermakezelési eljárásokra, amelyek során megváltozhat az eredeti, kiindulási sperma minősége.

Emellett a fluoreszcens módszerek további hiányossága, hogy a morfológiai értékelést nem teszik lehetővé. Sajnos, még nem áll rendelkezésünkre megbízható számítógépes módszer a teljes morfológiai analízishez.

A plazmamembrán épségének és funkciójának megléte alapvető fontosságú a spermium életképességének és termékenyítő-képességének szempontjából. Kovács és Foote (1992) tripánkék (TB)-neutrálvörös-Giemsma festést írt le az ondósejtek élő/elhalt és akroszóma állapotának kimutatására bika, sertés és nyúl spermiumokon, amely a morfológiai értékelést is biztosította. Az élő és elhalt farkak megkülönböztetését később közölték (Nagy és mtsai 1999). Azóta ezt a festési módszert több emlős fajon is sikerrel alkalmazták. A szimultán értékelés lehetővé teszi a valódi akroszóma reakció és a sejthalál után bekövetkezett "hamis akroszóma reakció" megkülönböztetését. Mélyhűtés és felolvasztás után szignifikánsan megnő a feji részen ép membránú, de festett, sérült farkú ménspermiumok aránya, melyek bizonyára mozgásképtelenek (Nagy és mtsai 1999). Ezért az ép/sérült farkak egyértelmű elkülönítése nagyon fontos az ondóminőség értékelésénél. A TB/Giemsma festés elfogadható ismételtőséget és jó egyezést mutatott a bikaspermiumokkal végzett fluorescein isothiocyanate-conjugated peanut agglutinin/ propidium iodide (FITC-PNA/PI) festés flow-citometriás értékelésével (Nagy és mtsai 2003). A festési technikát motilitás-analízissel, vagy hipoozmotikus teszttel (HOST) kombinálva használhatónak tartják a fertilitás előrejelzésére (Domes 2003, Tartaglione és Ritta 2004). A ménondósejtek esetében néhány speciális jellemző, illetve probléma merült fel a festési technika használatánál. Az egyik gond a hosszú (egyéjszakás) Giemsa-festés volt, a másik pedig az ép és a sérült farkak differenciálása, különösen a mélyhűtött minták esetében.

A mén fertilitását számos tényező befolyásolja, mint az apaállat ellátása (takarmányozás, elhelyezés, a sperma gyűjtése, kezelése és tárolása), és a tenyésztésbe vont kancák menedzselése is (a termékenyítés optimális időpontja, a kancák szaporodás-biológiai állapota és kondíciója). A legtöbb fertilitási tanulmányban a vizsgált mének és kancák kis száma miatt nem kaptak szignifikánsan eltérő eredményeket. A rutin termékenyülési adatok megbízhatósága alacsony, és lovon a gondosan megtervezett in vivo fertilitási kísérletek nagyon költségesek, még ha biológiai és etikai szempontból kivitelezhetők is. Ezen megfigyelések szerint a sperma laboratóriumi jellemzői és a későbbi fertilitása között nagyon nehéz pontos és hiteles összefüggéseket találni, különösen mélyhűtött sperma esetében. Sajnos, a lótenyésztés Magyarországon az utóbbi évtizedben hanyatlást mutatott, ami a tenyésztési,

termékenyítési és csikózási adatokban is megmutatkozik. A kísérleti időszakban nem volt lehetőségem megfelelő számú (min. 100 kanca/kezelési csoport) egyeden végzett in vivo vizsgálatra, de megkíséréltem a komplex festési módszer használatát szubfertilis mének spermájának laboratóriumi minősége és fertilitása közötti összefüggés kimutatására.

A tenyészmének kiválasztása elsősorban származásuk, sport teljesítményük, küllemük és más fenotípusos jellemzőik alapján történik, a fertilitás másodlagos. Ezzel magyarázható, hogy az egyes lovak spermájának minőségi mutatói igen változatosak, magas arányban nem megfelelőek. Meddőség és szubfertilitás a leggyakoribb aggodalmat keltő szaporodásbiológiai problémák a lótulajdonosoknak. Az infertilitás okának meghatározása viszont nem egyszerű feladat az állatorvosok számára. Szubfertilis mének tenyésztésbe kerülhetnek, amennyiben rendkívüli genetikai értékkel, kiváló sporteredményekkel bírnak, vagy ritka, kis létszámú génmegőrzött fajtákba (pl. Gidrán, Hucul) tartoznak. Az ilyen speciális esetekben a mén és spermája alapos vizsgálata szükségeltetik a további tenyésztési stratégia kidolgozásához. Szubfertilis mélyhűtött sperma esetében spermium-szeparálási eljárások utáni mély intrauterinális termékenyítés, vagy in vitro fertilizáció (ICSI) adhat esélyt a vemhesülésre.

2. A disszertáció célkitűzései

Az értekezés célkitűzései a következők voltak:

- (1) a komplex festési technika javítása, hitelesítése és alkalmazása mén spermiumok vizsgálatára, amely együttesen értékeli a spermiumok feji és farki membránjának integritását, akroszóma állapotát és morfológiáját.
- (2) A módszer alkalmazhatóságának vizsgálata két különböző gyakori in vitro technika során (ondó mélyhűtés, illetve spermium-szeparálás) és felhasználása a kezelések utáni spermaminőség változások értékelésére.
- (3) A módszer alkalmazása gyenge termékenyítőképeségű spermában kimutatható ondósejt anomáliák meghatározására.

A disszertáció célja, mindezekkel ráirányítani a figyelmet a festési eljárás és értékelési rendszer komplexitására és széles körű használhatóságára laboratóriumi kísérletekben, valamint a ménsperma minőség-ellenőrzés során, illetve a friss vagy feldolgozott ondó lehetséges termékenységi potenciáljának a meghatározására.

3. Anyag és Módszer

- Az **1, 2, és 4. vizsgálat** munkáit 2001-2008 között Magyarországon végeztem együttműködésben több Ló Mesterséges Termékenyítő Állomással. Laboratóriumi háttérrel az Állattenyésztési és Takarmányozási Kutató Intézet biztosította Herceghalmon. A **3. vizsgálatot** 2004-ben a Coloradói Állami Egyetem Állat Szaporodásbiológiai és Biotechnológiai laboratóriumában végeztem.

3.1 Vizsgált mének, spermaminták

- Az **1. kísérletben** a 0,16% Chicago sky blue (CSB)/Giemsa és a 0,27% tripánkék (TB)/Giemsa festési módszerek ismételhetőségét és a két élő/elhalt festék használatának egyezőségét 30 sperma mintán végeztem. A minták 10 méntől származtak vegyesen, nyers, hígított, centrifugált és fagyasztott spermák voltak. Mindegyik sperma mintából párhuzamosan készültek tripánkékekkel és Chicago sky blue – val is kenetek. Ezeket a keneteket hasonlítottam össze. A denzitometriás vizsgálat során 20 spermaminta szintén kétféle festéssel készült kenetét elemeztem. A minták 15 különböző méntől származtak.

- A **2. kísérletben** 10 mén ejakulátumának mélyhűthetőségét vizsgáltuk 3 ill. 4 ismétlésben (n=33). A lovak mindegyike mesterséges termékenyítésre használt tenyészmén volt. A sperma-fagyasztások random mintavételi időpontokban történtek 2001-2004 folyamán. A *Mén-9* ejakulátuma további 17 alkalommal is fagyasztásra került 2003 szeptember és. 2004 január között. A sperma-minőség változását a mélyhűtési folyamat egyes lépései utáni analízissel vizsgáltuk. A fagyasztások alkalmával a friss spermából, centrifugálás után, majd a mélyhűtött sperma felolvasztása után készítettünk keneteket (n=99).

- A **3. kísérletben** gyenge-közepes minőségű fagyasztott spermát használtam (200 x 10⁶/ml sejtkoncentrációban, EZ-Freezin-LE hígítóval mélyhűtve, 0.5-ml-es műszalmákban, a felolvasztás utáni progresszív motilitás ≤ 30% volt) 3 méntől, 3 ismétlésben. Két szalmát olvasztottam fel 38 °C-on 30 mp-ig és összekevertem a tartalmat. Az egyes sperma-szuspenziókból 100-100 µl mintát használtam mind a 7 spermium-szeparálási kezelési csoportnál.

- A **4. vizsgálatban** 14 jó fertilitású és 10 csökkent fertilitású mén spermamintáit elemeztem. Sperma keneteket készítettem 10 fertilis és 10 szubfertilis mén friss ejakulátumából és 5 fertilis és 4 szubfertilis mén hűtött spermamintájából 1 napos 4°C-on történő tárolás után. A mintákat morfológiai és kombinált élő/elhalt-morfológiai kategóriák szerint értékeltem. A mének különböző fajtájú és korú állatok voltak. Az összes mén tenyészménként volt felállítva különböző ménesekben és Mesterséges Termékenyítő Állomásokon. A fertilis és szubfertilis méneket az általuk termékenyített és sikeresen vemhesült vagy üresen maradt kancák aránya alapján ítélték jó termékenyítő képességűnek, illetve csökkent fertilitásúnak a mesterséges termékenyítő állomást vezető állatorvosok.

3.2 Ménsperma fagyasztási protokoll

A 2. kísérletben, a mélyhűtési eljárás Vidament és mtsai (2000) közleménye alapján történt. Spermavétel után a gél-frakciótól elválasztott ejakulátumot centrifugáló hígítóval (INRA82 + 2 tf % centrifugált tojássárga) 1:2 vagy 1:3 arányban hígítottuk 37 °C-on. A hígított sperma szobahőmérsékletre hűlése után a centrifugálást 600g-n 10 percig végeztük. A felülúszó eltávolítása után a reszuszpendálás tojássárgát és Glicerint tartalmazó INRA-82 mélyhűtő hígítóval (100 millió/ml koncentrációban) történt. Az egyensúlyi paraméterei a következők voltak: hűtés 22°C-ról 4°C-ra 1 óra alatt (-0.3°C/perc-hűtési sebesség), majd tárolás további 1 óráig 4°C-on. A mélyhűtés: 0,5 ml-es műszalmákban történt, folyékony nitrogén (LN) fölött 4 cm-re helyezve 10 percig, majd LN-be merítés következett. A felolvasztást 37°C-on 30 mp-ig végeztük.

3.3 Spermium szeparálás (3. kísérlet)

Mini-Percoll: Három mintát (100 µl) 38°C-on 5% CO₂-ot tartalmazó légtérben 20 percig inkubáltam 0,25 ml HCDM (Hepes-buffered chemically defined handling medium)-ban [P-NT: stimuláló vegyület nélküli; P-PX: 3,5 mM pentoxifillint (PX); P-HA: 1 mg/ml HA végső koncentrációt tartalmazó médiumban] a Percoll®-centrifugálás előtt. Egy minta Percoll® kezelése előzetes inkubáció nélkül történt (P-CON). A felhasznált mini-Percoll két rétegű gradiens volt: 0,4 ml 90% and 0,5 ml 45% Percoll®-t tartalmazott 1,5-ml-es mikrocentrifuga csőben. Az inkubált és inkubáció nélküli minták a Percoll® gradiensek tetejére lettek rétegezve. A centrifugálási paraméter: 600 x g 5 perc volt. 30-µl pelletet aspiráltam a cső aljáról majd 1 ml HCDM médiumban 300 x g-n 5 percig mostam.

Swim-up: A Percoll kezelésekkel párhuzamosan 100-100 µl spermát helyeztem 1 ml HCDM médiumba swim-up (SU) kezelés céljából: (SU-NT: nem-kezelt; SU-PX: 3,5 mM PX; és SU-HA: 1 mg/ml HA végső koncentrációban) majd 38°C -on, 5%-os CO₂ légtérben 30 percig inkubáltam 5 ml-es homorú-aljú csőben. Inkubáció után 0,65 ml felülúszót pipettáztam le, amit 1 ml HCDM médiumban 300 x g – n 5 percig centrifugáltam.

Minden egyes kezelésnél 30-µl pelletet aspiráltam a csövek aljáról. A kinyerési arány meghatározásához 5-µl mintát 95 µl desztillált vízzel elegyítettem, majd a sejtkoncentrációt hemocitometerrel számoltam. A *kinyerési arány* az eredeti fagyasztott sperma sejtűrűségének (200 million/ml) a százalékos arányában lett kifejezve. Kenetkészítéshez 10-µl mintát használtam. A spermium fejl-, farokrész és akroszóma *membran-integritásának* vizsgálata és *morfológiai analízise CSB-Giemsa* festési eljárással történt.

3.4 A spermiumok értékelése

Festési eljárás, felhasznált anyagok

A standard festési eljárás során *élő/elhalt festésre* 0,27% tripánkék (TB) oldatot (Sigma T-8154 0,4 %-os törzsoldat pufferolt NaCl-al /PBS/ 2:1 arányban hígítva) használtunk, A 0,16 % Chicago sky blue (CSB) oldatot 2,6%-os CSB /Sigma C-8679/ törzsoldat 1:15 arányú PBS-el történő hígításával kapjuk. *Fixálóként* 0,2% neutrálvíz (Sigma N-2880) és 5% formalint tartalmazó 1N HCL (9 rész desztillált víz/1 rész cc. HCl) oldatot, az *akroszóma festésére* 7,5% Giemsa törzsoldatot (Sigma GS-500) (4 ml Giemsa oldat + 50 ml desztillált víz) használtunk, amit festés előtt frissen készítettünk.

1. A ménspermiumok érzékenyek a kémhatás, ozmolalítás és hőmérséklet változásaira, ezért a spermát festés előtt azonos hőmérsékletű, pufferolt NaCl oldattal (0,06% K₂HPO₄ anhidrátot és 0,825% NaCl-ot tartalmazó oldat) hígítottuk. A hígítás mértéke: friss ejakulátum és hűtve tároláshoz, illetve centrifugáláshoz hígított (-sovány tejpport vagy tojássárgát tartalmazó hígítóval 1:1 vagy 1:2 arányban-) sperma esetén 1:4; centrifugált és fagyasztott sperma (-100-200 millió/ml koncentrációjú spermium-szuszpenzió, tojássárgát és glicerint tartalmazó hígítóban-) esetén 1:9 arányú.
2. A tárgyalemez közepére egy csepp CSB vagy TB élő/elhalt festéket, majd arra egy csepp spermát tettünk, óvatosan összekevertük egy másik tárgyalemez

folyadékréteghez történő érintésével és mozgatásával, anélkül, hogy a lemezek karcolnák egymást, majd a párhuzamosan elhúzott lemezekkel két kenetet készítettünk.

3. Légszárítás közel függőleges helyzetben.
4. A keneteket 4 percig fixáltuk.
5. Öblítés csap-, majd desztillált vízzel.
6. A Giemsa-festést 2-4 óráig, fedetlen, álló festőkádban 25-40°C-on végeztük.
7. Öblítés csapvízzel, 2 perc differenciálás desztillált vízben.

Légszárítás után a keneteket lefedtük Entellán-nal (Merck 1.07960, Darmstadt, Németország), majd fénymikroszkópban 100x immerziós objektívvel 1000x-es végleges nagyításon vizsgáltuk. A kenetek fénymikroszkópos vizsgálatánál sárga fényszűrőt alkalmaztam (~500 nm), így az egyes színárnyalatok sokkal jobban elkülöníthetőek, jobban differenciálhatóvá válnak az egyes sejtípusok.

Élő/elhalt értékelés

- Kenetenként 300 sejtet osztályoztam és **5 sejt kategóriába** soroltam az **1. és 3. kísérletben**: élő fejű, élő farkú, ép akroszómájú spermiumok (Intact); élő fejű, élő farkú, sérült akroszómájú sejtek (IHITDA); ép fejű, sérült farkú, ép akroszómájú sejtek (IHDT); elhalt fejű, élő farkú spermiumok (DHIT); elhalt, sérült fejű, farkú, sérült- vagy levált akroszómájú sejtek (DHDTDA).

- A **2. és 4. vizsgálatban** az ép membránú sejteket morfológiailag is értékelve kombinált kategóriákba soroltam az ondósejteket. Kenetenként 200-300 sejtet számoltam meg és **8 sejtípust** különítettem el:

IHTIA: élő fejű, élő farkú, ép akroszómájú spermiumok, morfológiai rendellenességek nélkül

IPD: élő fejű, élő farkú, ép akroszómájú sejtek, proximális plazmacseppel

IDD: élő fejű, élő farkú, ép akroszómájú sejtek, disztális plazmacseppel

IBT: ép fejű, farkú és akroszómájú, középrész vagy farokrendellenességet mutató (megtört, hajlott, felcsavarodott középrészű vagy farkú) sejtek

IHTDA: élő, sérült akroszómájú sejtek

IHDT: élő fejű, elhalt farkú, ép akroszómájú sejtek

DHIT: elhalt fejű, élő farkú spermiumok

DHDTDA: elhalt, sérült- vagy levált akroszómájú sejtek

- A **2. kísérletben** további összevont és kombinált kategóriákat is kialakítottam és értékeltem:

1. Elhalt spermium, plazmacseppel [**DCD**]
2. Elhalt spermium, visszahajlott középrész-. farkok [**DBT**]
3. Összes „élő”, intakt membranú [IHITA + IPD + IDD + IBT] **Intact**
4. „Élő” plazmacseppes + visszahajlott farkok [IPD + IDD + IBT] **ICDBT**
5. Összes plazmacseppes spermium [IPD + IDD + DCD] **IDCD**
6. Összes visszahajlott középrészű- és farkrészű sejt [IBT + DBT] **IDBT**
7. Összes plazmacseppes és visszahajlott farkú sejt [IDCD + IDBT] **IDCDBT**

Morfológiai elemzés

A sejteket **5 egyszerű morfológiai kategóriába** soroltam a **3. kísérletben**:

1. **Normál alak**
2. **Proximális plazmacsepp**
3. **Disztális plazmacsepp**
4. **középrész és farkok rendellenesség (midp+tail)**
5. **Rendellenes fej**

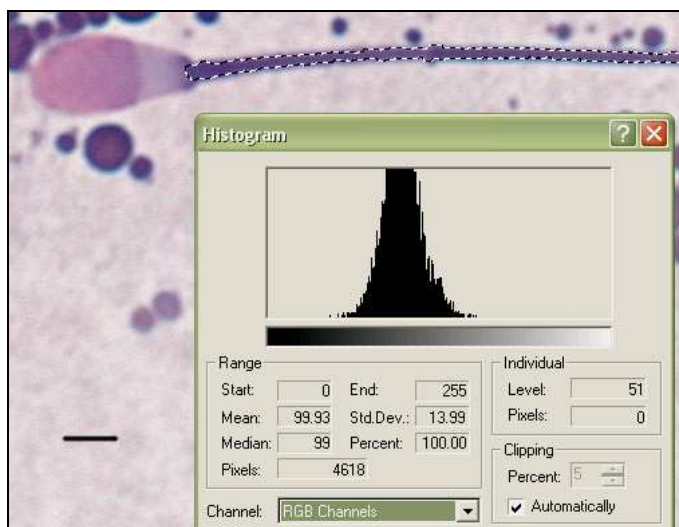
A spermiumokat **9 morfológiai kategóriába** soroltam a **4. vizsgálatban**:

1. **Normál alak**
2. **Rendellenes fej** (kicsi, nagy, kerek, keskeny, körte, akroszóma defekt stb.)
3. **Rendellenes középrész** (megvastagodott, hajlott, megtört, DMR, hiányos mitokondrium stb.)
4. **Rendellenes fark I.** (megtört, hajlott, hajtúszerű, stb.)
5. **Rendellenes fark II.** (feltekeredett középrész és fark, dag-like defekt)
6. **Levált fej**
7. **Proximális plazmacsepp (PD)**
8. **Disztális plazmacsepp (DD)**
9. **Többes alakok**

Scanning és transzmissziós elektronmikroszkópos vizsgálatokat végeztünk a *Mén-9* spermamintáján a **2. kísérletben**.

3.5 Az adatok értékelése, statisztikai módszerek

- Az **1. kísérletben** Bland-Altman módszer-egyetértési statisztikai analízist alkalmaztam (Bland és Altman 1986, Nagy és mtsai 2003). Az ismételhetőségi vizsgálathoz és a két spermafesték összehasonlításához az “élő”, Intakt sejtek és az összes sérült fark-membránú sejtek százalékos arányát hasonlítottam össze külön-külön. A denzitometriás analízishez digitális mikroszkópos képeket készítettem a kétféle festéssel preparált, azonos spermamintából származó kenetekről. Corel Photo-Paint 8 software “Magic Wand Mask tool” alkalmazását használtam a fej és fark területek jelölésére, amelyek analízisekor red-green-blue (RGB) histogramok adatait vettem figyelembe (**1. ábra**).



1. ábra Spermium, ép fej-, sérült fark-membránnal. CSB/Giemsa festés. A festett farkrész szaggatott vonallal jelölve. A histogram a kijelölt terület RGB értékeit mutatja. Vonal = 2 μ m.

Az élő és elhalt farkak és külön az élő és elhalt fejek RGB értékeinek különbségeit hasonlítottam össze a két festés esetén. Összesen 120 fotót készítettem és 480 hisztogramot analizáltam a különböző területekről. Az adatok elemzésére párosított kétmintás T-próbát használtam SPSS 11.0. Statisztikai program segítségével.

- A **2. kísérletben** a mélyhűtések alkalmával a friss spermából, centrifugálás után, majd a fagyasztott sperma felolvasztása után készítettünk keneteket (n=99). A mikroszkópos vizsgálathoz morfológiával kombinált membránintegritás alapján 8 sejtípust alakítottunk ki, ezen túl összevont kategóriákat is kiértékelünk. A statisztikai elemzésnél párosított T próbát használtunk „R” szoftver segítségével.

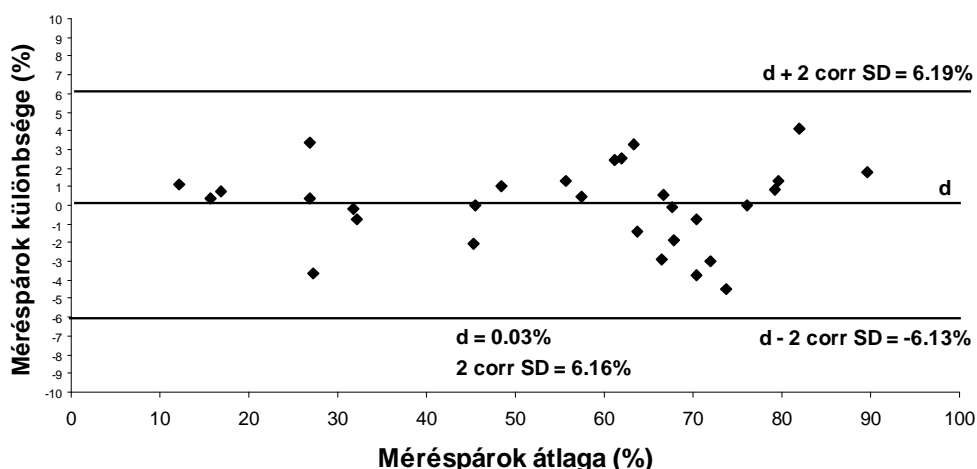
- A **3. kísérletben** az adatokat (kinyerési arányok és a különböző sejttípusok százalékos aránya a 7 kezelési csoportban a spermium-szeparálás után) SAS statisztikai szoftver (SAS Inst. Inc., Cary, NC, USA) segítségével elemeztem. Az adatok arcsin transzformáció után GLM variancia analízissel lettek értékelve. Az átlagok összehasonlítására Tukey's tesztet használtunk.

- A **4. kísérletben** 10 szubfertilis mén spermamintáinak értékelését, a kórelőzményekkel együtt, az irodalmi adatokkal ütköztetve és a lehetséges megoldási javaslatokat esetismertetések formájában tárgyalom. A fertilis ménnek élő/elhalt és morfológiai vizsgálatának eredményeiből számolt átlagértékek; a minőségi paraméterek minimális feltételei, a különböző spermium morfológiai kategóriák határértékei és átlagértékei az irodalmi adatok és a tenyészménpermára vonatkozó magyar szabvány (7034/1999) szerint, szolgáltak összehasonlítási alapként az elemzés során.

4. Eredmények

4.1 A ménsperma bírálat fejlesztése Chicago sky blue és Giemsa élő/elhalt és akroszóma festési módszerrel

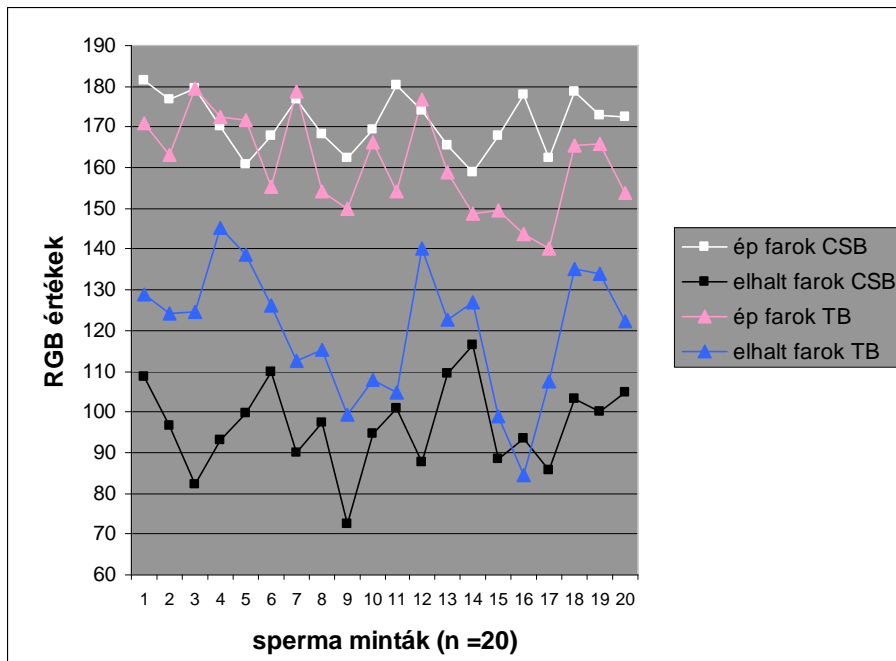
CSB/Giemsa fetés jó ismételhetőséget és módszer-egyetértést mutatott a standard TB/Giemsa mérésekkel (**2. ábra**).



2. ábra TB/Giemsa és CSB/Giemsa festés módszer-egyetértési vizsgálata az élő, ép sejtek megszámolásával a keneteken. A pontok a méréspárok különbségeit jelzik az átlaguk függvényében. A méréspárok közötti átlagos eltérés (d) = 0,03%, a szórás (SD) = 2,18%, a 95%-os egyetértési határok (d ± 2 corrSD) = -6,13 és 6,19%. (n = 30).

95%-os egyetértési határok ($d \pm 2 \text{ corrSD}$) = -6,13 és 6,19% közel azokat az értékeket mutatták, mint a TB és CSB ismételhetőségi vizsgálatában a British Standard ismételhetőségi koefficiens (2SD) távolsága az ismételt mérések közötti átlagos eltéréstől (d): $d \pm 2 \text{ SD}$ az ismételt mérésekben: TB: -5,19, 5,75%; CSB: -6,44, 4,90%.

A Chicago sky blue (CSB) festék hasonló spermium fej- és tökéletesebb ondósejt farkok élő/elhalt differenciálást eredményezett a tripánkékhez (TB) képest. A szubjektív vizsgálat megállapítása denzitometriás analízissel megerősítést nyert. (3. ábra).

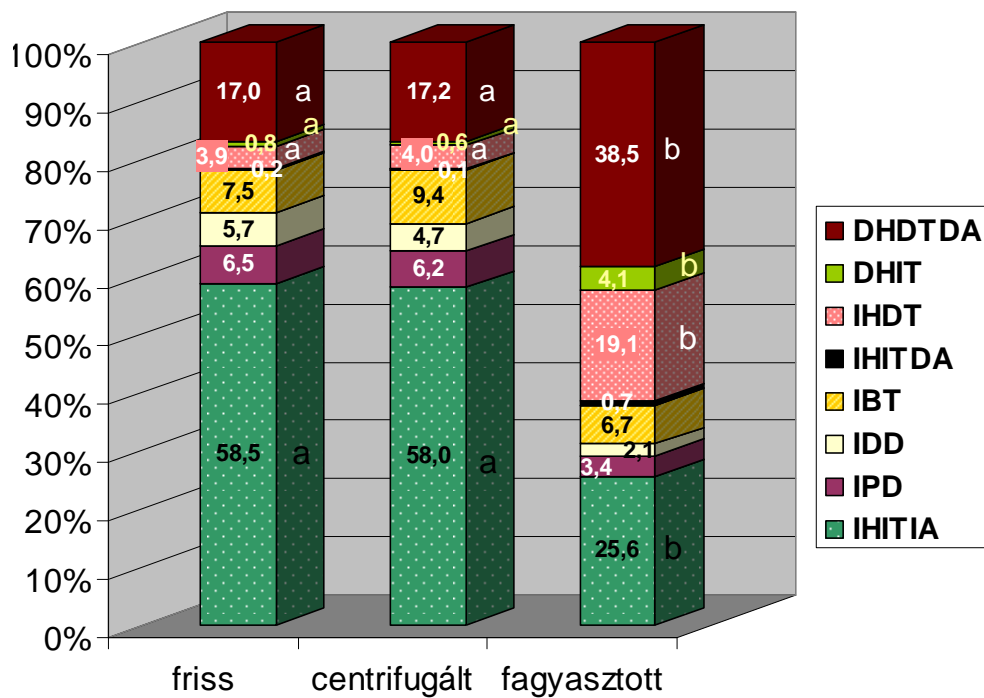


3. ábra A festett (elhalt) és festetlen (ép) spermium farkak RGB értékeinek átlagai az egyes sperma mintákban a kétféle festéssel

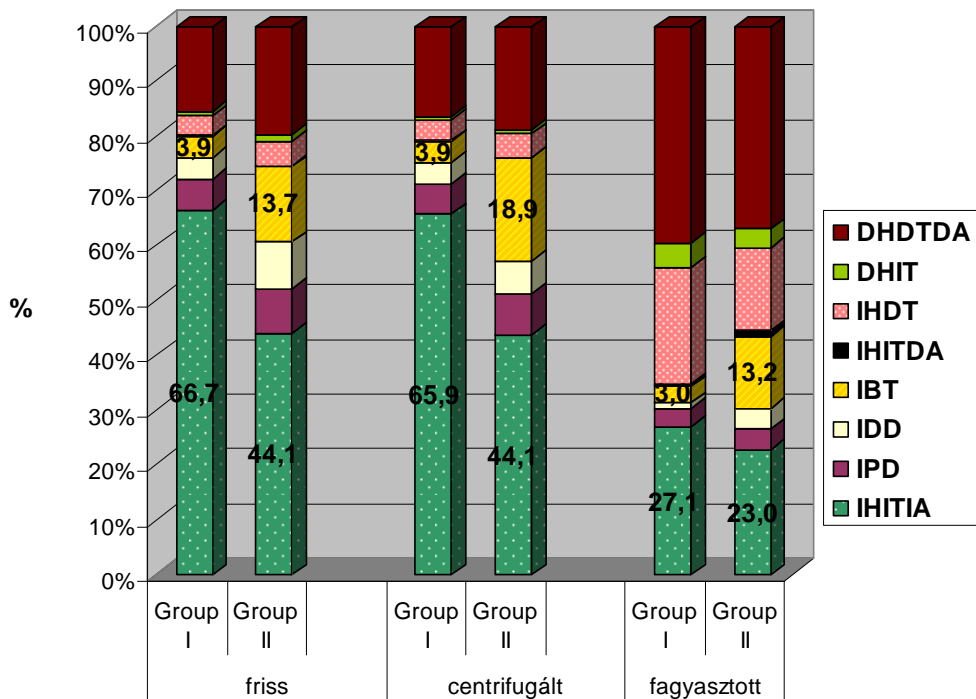
A TB festék biztonságosan felváltható a CSB vitális festékekkel ménsperma esetén, a farkmembrán épségének pontosabb és könnyebb meghatározását biztosítva. A háttérfestődés CSB festés után homogénebb, mint TB esetén. 4 percig történő fixálás erősebb „elhalt” jelölést eredményezett elfogadható háttérfestődéssel. A ménspermiumok akroszómája meglehetősen gyorsan festődik Giemssával, ami lehetővé teszi, hogy 2-4 óra alatt értékelhető mintát kapjunk.

4.2 Mén ondósejtek károsodásainak elemzése a mélyhűtési folyamat során

Az élő, ép akroszómájú sejtek aránya a centrifugálás során nem változott (78 ± 9 vs. $78\pm 8\%$), a felolvasztott spermában viszont szignifikánsan csökkent ($38\pm 11\%$, $p<0,01$). Ezen belül a normál morfológiájú sejtek aránya ugyanazt a tendenciát mutatta (58 ± 16 ; 58 ± 15 ; $26\pm 9\%$, $p<0,01$). Az ép fej-, sérült farok-membránú sejtek aránya a feldolgozás során csak a fagyasztás/felolvasztás után növekedett (4 ± 3 ; 4 ± 3 ; $19\pm 7\%$, friss, centrifugált, fagyasztott, sorrendben, $p<0,01$) (**4. ábra**). Vizsgálatainkban azt tapasztaltuk, hogy centrifugálás is okozhat a hidegsokkhoz és hipoozmotikus sokkhatáshoz hasonló morfológiai elváltozást (farokrész visszahajlása, vagy feltekeredése) és ez a hatás egyes méneknél fokozottan jelentkezett. Az esetek jellemzően 3 ménhez voltak köthetők /Group II/ ($19\pm 4\%$, $p<0,01$), amelyeknél már a friss spermában is magas arányban volt ez a sejt típus: $14\pm 5\%$, ellentétben a másik 7 ménnél (Group I), ahol e sejt típus $4\pm 2\%$ -ban volt jelen. A 3 mén centrifugált spermájában $19\pm 4\%$ -ra emelkedett ($p<0,01$), ami jellemzően a fagyasztás után is relatíve magas arányt képviselt ($13\pm 5\%$), amellet, hogy a normál morfológiájú élő sejtek aránya nagy mértékben csökkent (44% -ról 23% -ra). A többi 7 ménnél nem változott lényegesen a centrifugált ($4\pm 3\%$) és a fagyasztott (3 ± 1) spermában sem (**5. ábra**). Az élő sejtek akroszómájának sérülése, illetve leválása nem volt jellemző a fagyasztás után sem, az IHITDA sejt típus kevesebb, mint 1% -os arányban volt jelen. Az összes plazmacseppes+farok-rendellenességet mutató sejtek aránya nem változott a feldolgozás során (25 ± 15 ; 26 ± 15 ; $24\pm 15\%$). Az összes farok-rendellenességgel rendelkező sejtek aránya enyhén emelkedett (10 ± 7 ; 12 ± 10 ; 12 ± 10), az összes plazmacseppel rendelkező sejtek aránya pedig enyhe csökkenést mutatott a feldolgozás során (15 ± 9 ; 13 ± 8 ; 12 ± 8). Ez több esetben azzal magyarázható, hogy a plazmacseppes-középrészen a centrifugálás után visszahajlás alakul ki, a plazmacsepp pedig megreked a hajtúkanyarban.



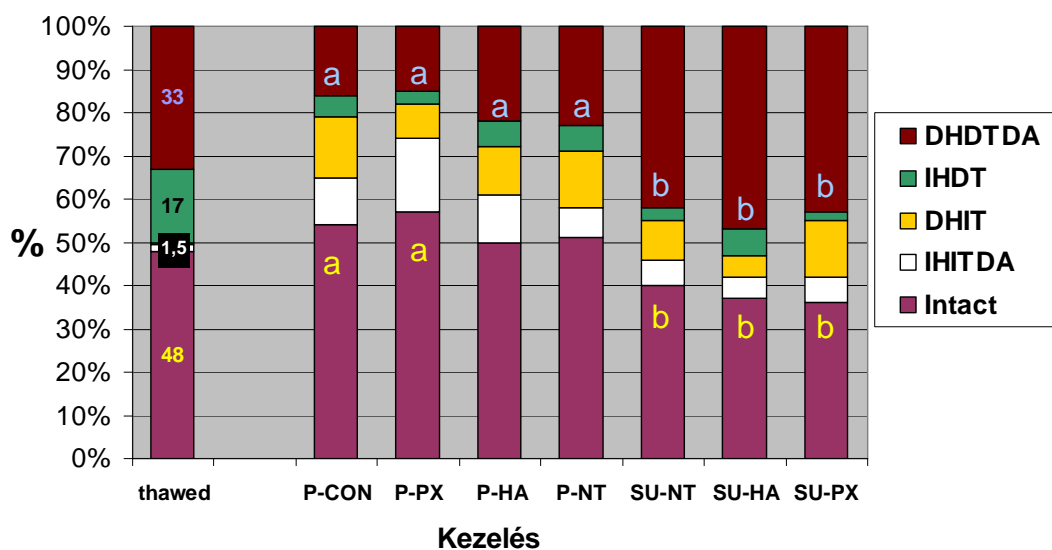
4. ábra Különböző sejtkegóriák eloszlása a spermafagyasztás technológiai lépései során (10 mén, 33 spermaminta mélyhűtése). a, b betűjelek azonos kategórián belül szignifikáns különbséget jeleznek ($p < 0.01$)



5. ábra Az eltérő sejtípusok aránya az egyes technológiai lépések után a 2 mén csoport esetén (az ismétlések átlagértékei, Group I: 7 mén, $n = 21$ és Group II: 3 mén, $n = 12$)

4.3 Pentoxifylline és Hialuronsav alkalmazása ménsperma szeparálására

A Percoll szeparációs eljárást sikeresen módosítottam a médium térfogatának csökkentésével (Mini-Percoll: 0,4 ml 90% és 0,5 ml 45% Percoll 1,5 ml-es mikrocentrifuga csőben), a centrifugálás időtartamának rövidítésével és magasabb g-érték használatával (600 x g 5 percig), hogy növeljem az életképes spermiumok kinyerésének hatékonyságát ICSI-re, kis térfogatú, alacsony sejtkoncentrációjú ménsperma elérhetősége esetén. A kísérlet célja a mini-Percoll (P) és swim-up (SU) módszer összehasonlítása volt alacsony spermium-számú minták esetén, stimuláló vegyületekkel történő inkubáció nélkül (P-CON, P-NT és SU-NT), pentoxifyllinel (PX), illetve hialuronsavval (HA) történő kezelést alkalmazva. A spermium szuszpenzió Mini-Percoll-os szeparációja inkubáció nélkül (P-CON) és 3,5 mM pentoxifylline-el történő inkubáció után (P-PX) eredményezte a legtöbb morfológiailag normál, intakt spermiumot (54 és 57 % intakt, 92 és 91% morfológiai normál sejt, 13 és 13 % kinyerési arány, sorrendben). Az összes Percoll-szeparációs kezelés több normál morfológiájú spermiumot és kevesebb plazmacseppet-, vagy közép+farokrész rendellenességet tartalmazó ondósejtet eredményezett, mint a swim up szeparálások (91-92% vs.71-78%; 1% vs.4-7%; 6-7% vs.16-19% sorrendben, $p < 0.01$). Spermium szeparálás után magas arányban fordult elő sérült fejű, ép farki részű spermium (DHIT). A DHIT sejtípus aránya a P-CON, P-NT (Mini-Percoll szeparáció kémiai vegyület nélküli inkubáció után) és SU-PX (3,5 mM pentoxifylline kiegészítés a swim-up médiumban) kezelési csoportokban volt a legmagasabb (14%, 13% és 13%, sorrendben). P-PX kevesebb DHIT sejtet eredményezett a P-CON kezeléshez képest (8 vs. 14 %, $P > 0,05$). Az ép, de akroszóma-sérült sejtek (IHITDA) aránya P-PX kezelés után volt a legmagasabb ($17 \pm 1,6$ %). Ezek a spermiumok kiürülőben lévő, vagy már kiürült akroszómát tartalmaznak, ami előnyös lehet az ICSI általi petesejt megtermékenyítés során. A PX, úgy tűnik előmozdítja az akroszóma reakciót, főleg a destabilizált membránú spermiumok esetében. Individuális különbségeket tapasztaltam a mének között az akroszóma-membrán reaktivitásában. A HA kezelés növelte a kinyerési arányt a swim up szeparálás során, viszont az élő és morfológiailag normális sejtek arányát egyik kezelési csoportnál sem.



a,b betűjelek azonos sejtkategórián belül szignifikáns különbséget jeleznek az értékek között ($p < 0.01$)

6. ábra A különböző élő/elhalt sejtkategóriájú spermiumok százalékos eloszlása a kezelések után

4.4 Szubfertilis mének spermamintáinak élő/elhalt, akroszóma és morfológiai értékelése

A szubfertilis méneknél a komplex festési módszerrel minden esetben kimutatható volt, hogy a sperma minősége membránintegritás szempontjából vagy az ondósejtek morfológiája szempontjából elmarad a fertilis mének eredményeitől. Sok esetben igen komoly morfológiai defektusokat mutattak, és/vagy az élő, ép membránú és normál morfológiájú spermiumok arányának drámai csökkenését tapasztaltam, más membrán-sérült sejtkategóriák emelkedése mellett. A „H” mén friss spermamintáinak elemzése során látványos különbség mutatkozott a kétféle hígítóval (tojássárga-sovány tej-alapú és sovány tejpor-glükóz-alapú alapú hígítók) történő elegyítés után. A tejporos hígítót nem jól tolerálták a sejtek, gyenge spermium túlélés volt tapasztalható. A szubfertilis mének eredményei minden esetben elmaradtak a magyar szabvány (7034/1999) ménspermára vonatkozó leírásától is, mely szerint a frissen nyert ménspermában 30% rendellenes felépítésű spermium jelenléte megengedhető, ha ennek kevesebb, mint a fele primer elváltozás. A fertilis és szubfertilis mének friss spermamintáinak morfológiai és élő/elhalt értékelése során kapott eredményeket az **1-4. Táblázatok** mutatják be.

1. Táblázat A fertilis mének friss spermamintáinak morfológiai eredményei (%)

Mén	Normál	Fej	Közép-rész	Farok I	Farok II	Levált fej	PD	DD	Többes alak
1	73,5	1,7	3,1	2,9	1,0	1,8	14,1	2,1	0,0
2	76,5	0,8	1,9	2,5	1,8	0,5	4,5	11,7	0,0
3	71,7	0,9	3,6	7,3	2,7	0,4	5,0	8,4	0,3
4	78,5	1,5	6,9	2,9	1,4	0,4	3,9	4,8	0,0
5	81,3	5,2	3,2	2,8	1,3	0,7	3,7	1,8	0,0
6	73,4	4,0	2,5	4,3	1,9	1,5	9,5	2,9	0,0
7	76,6	3,6	3,3	5,1	1,2	0,9	5,3	3,1	0,9
8	89,2	0,0	1,6	4,9	0,9	1,3	1,2	1,2	0,0
9	80,1	1,5	5,3	3,1	1,0	0,4	6,3	2,4	0,0
10	83,4	0,7	7,0	1,9	0,5	1,8	2,5	2,3	0,2
Átlag	78,4	2,0	3,8	3,7	1,4	1,0	5,6	4,1	0,1
Szórás	5,3	1,7	1,9	1,6	0,6	0,6	3,7	3,4	0,3

2. Táblázat A szubfertilis mének friss spermamintáinak morfológiai eredményei (%)

Mén	Normál	Fej	Közép-rész	Farok I	Farok II	Levált fej	PD	DD	Többes alak
A	24,7	41,0	2,0	6,0	4,7	1,7	15,0	4,0	1,0
B	28,0	41,0	4,7	4,0	5,7	3,7	10,0	3,0	0,0
C*	32,5	16,0	9,5	1,0	2,5	4,0	31,0	3,5	0,0
C**	30,0	19,3	11,3	2,3	5,5	4,0	24,3	3,3	0,0
D	31,4	9,5	1,9	0,9	1,2	6,9	47,0	1,1	0,2
E	40,5	6,7	11,3	13	2,5	1,3	22,7	2	0
F	52,5	21,6	9,4	3,8	3,8	1,3	6,6	1,3	0,0
G	50,0	1,0	13,2	3,6	2,9	2,1	14,7	11,5	1,0
I [■]	52,7	2,3	22,7	3,7	2,3	7,0	4,7	4,7	0,0
I [■] ■	42,0	2,0	21,3	10,8	5,0	7,5	2,1	9,3	0,0
J	50,5	3,3	8,8	2,0	1,5	1,7	5,0	26,8	0,3

* A júniusban gyűjtött spermaminta morfológiai értékelése

** Az augusztusban gyűjtött spermaminta morfológiai értékelése

■ A júniusban gyűjtött spermaminta morfológiai értékelése

■ A júliusban gyűjtött spermaminta morfológiai értékelése

3. Táblázat A fertilis mének friss spermamintáinak élő/elhalt eredményei (%)

Mén	IHTIA	IPD	IDD	IBT	IHTDA	IHDT	DHIT	DHDTDA
1	67,2	12,9	1,7	2,8	0,0	2,6	0,2	12,7
2	71,1	3,3	9,8	4,5	0,0	3,3	1,3	6,7
3	61,8	3,8	6,0	11,5	0,0	6,5	1,3	9,3
4	71,8	3,8	4,7	5,8	0,1	2,8	0,4	10,6
5	73,6	4,1	0,9	3,3	0,1	3,7	0,8	13,4
6	62,1	7,3	2,1	3,8	0,0	5,3	0,5	19,0
7	62,2	3,4	2,0	7,2	0,3	4,2	1,3	19,6
8	79,8	2,9	1,0	2,3	0,5	2,7	2,2	8,7
9	52,5	3,2	1,5	2,9	0,3	5,8	2,8	31,0
10	72,1	2,2	1,5	1,3	0,0	2,9	0,4	19,7
Átlag	67,4	4,7	3,1	4,5	0,1	4,0	1,1	15,1
Szórás	7,9	3,2	2,9	3,0	0,2	1,4	0,8	7,3

3. Táblázat A szubfertilis mének friss spermamintáinak élő/elhalt eredményei (%)

Mén	IHTIA	IPD	IDD	IBT	IHTDA	IHDT	DHIT	DHDTDA
A	9,5	3,0	1,0	6,5	1,0	8,0	0,0	71,0
B	14,0	6,0	0,0	5,0	0,0	4,0	5,0	66,0
C *	12,6	14,7	1,8	4,9	0,0	12,3	5,8	48,0
C **	10,0	10,7	3,3	3,3	0,0	2,0	0,7	70,0
D	12,0	41,5	0,5	1,0	1,5	11,0	9,0	23,5
E	1,5	4,5	0,5	5,0	1,5	28,0	0,0	59,0
F	19,0	3,0	0,7	5,0	0,7	9,0	6,0	56,7
G	36,3	10,0	8,0	10,0	0,3	12,7	0,9	21,8
H #	35,8	8,3	0,8	11,3	1,0	3,5	1,3	38,3
H ##	12,0	2,5	1,5	18,0	0,0	5,0	0,0	61,0
I ■	37,7	2,3	4,3	13,3	0,0	2,7	4,0	35,7
I ■■	30,0	0,0	11,0	17,5	0,5	5,0	2,5	33,5
J	47,0	3,7	21,3	11,3	0,2	1,1	2,2	13,5

* A júniusban gyűjtött spermaminta morfológiai értékelése

** Az augusztusban gyűjtött spermaminta morfológiai értékelése

Tojássárga-sovány tej-alapú hígító használatával

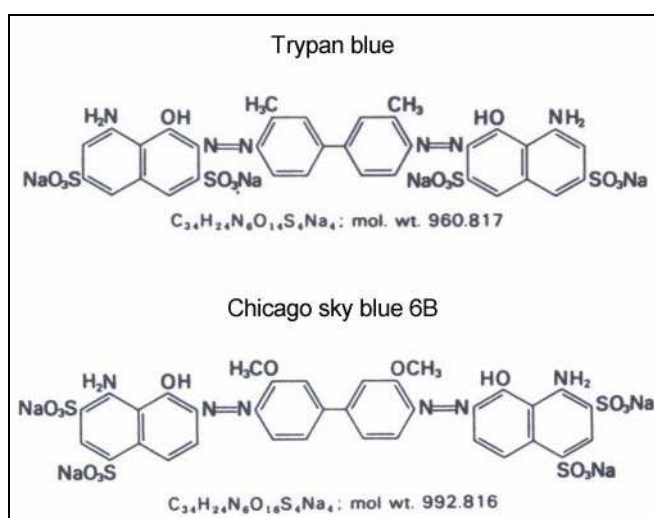
Sovány tejpor-alapú hígító használatával

■ A júniusban gyűjtött spermaminta morfológiai értékelése

■■ A júliusban gyűjtött spermaminta morfológiai értékelése

5. Megbeszélés, következtetések és javaslatok

5.1 A tripánkék-Giemsza festéssel – különösen a mélyhűtött mintákban – gondot jelentett az élő és elhalt farkak megkülönböztetése. A ménondósejtek kicsik és az ondóplazmában és a hígítóban lévő fehérjék a tripánkéket részben megkötve növelik a háttérteret és ugyanakkor csökkentik az élő, illetve elhalt sejtek festődése közötti különbséget. Az **1. kísérlet** célja a komplex festési technika javítása és továbbfejlesztése volt, egyrészt egy másik élő/elhalt festék, a Chicago sky blue 6B (CSB) alkalmazásával, amelynek molekulá szerkezete hasonló a tripánkékéhez; másrészt a festés egyes lépéseinek optimális beállításával a különböző spermium kategóriák hatékonyabb és egyértelműbb elkülönítésének megoldása elsősorban mén spermiumok vizsgálata esetén. A tripánkékéhez hasonló molekulá szerkezetű olyan élő/elhalt fetéket kerestünk, amelynek nagyobb kötődési képessége a membrán-permeáblis spermium-farokrész fehérjeihez. A Chicago sky blue 6B vegyületet választottuk a tripánkékével történő összehasonlításához. A tripánkék és a Chicago sky blue festékek képesek arra, hogy különböző fehérjékhez – így a lineáris szerkezetűekhez is - közvetlenül, feltehetően hidrogen-kötéssel kapcsolódjanak (Lillie 1977). A Chicago sky blue erősebb affinitást mutat az ondósejtek farki részében lévő fehérjékhez, mint a tripánkék, feltehetően annak köszönhető, hogy a két hasonló molekulájú festék közül a Chicago sky blue kettővel több olyan csoportot tartalmaz, amelyek hidrogen-kötésre képesek, mint a tripánkék (**7. ábra**).



7. ábra A tripánkék és a Chicago sky blue kémiai szerkezete (Lillie 1977)

Előkísérleteink során a kenetek több mint egy nappal későbbi fixálása a fej halvány elszíneződését okozta, ezért ezt ajánlatos a kenetkészítés napján, minél hamarabb elvégezni. 4 percig történő fixálás erősebb „elhalt” jelölést eredményezett elfogadható háttérfestődéssel. A ménspermiumok akroszómája meglehetősen gyorsan festődik Giemzával, ami lehetővé teszi, hogy 2 óra alatt értékelhető mintát kapjunk. A Giemsa festést elengedhetetlen minimálisan szobahőn végezni, mivel alacsony hőmérsékleten (20°C alatt) az akroszóma nem festődött. A levegővel való érintkezés is fontos, különösen rövidebb festési idő esetén. Az ondóplazma és hígító proteinjei által előidézett háttér nagymértékben csökkent a Giemsa festés 2-4 órás, 25-40°C-on történő lerövidítése folytán. Összegezve, ménsperma-minták esetén a 0,16%-os CSB-vel történő vitális festés utáni 4 perces fixálás és 25-40°C-on, 2-4 órás Giemsa festés ajánlott úgy a rutin, mint a kutatómunkában.

A különböző sejtrészek membrán integritásának festődésén alapuló értékelése során a sejteket általában öt csoportba soroltuk: ép fej, fark és akroszóma-membrán; ép fej, fark és sérült, vagy hiányzó akroszóma; ép fej sérült fark; sérült fej, ép fark; sérült fej, fark és akroszóma. A kísérleti periódusban új bírálati kategóriákat határoztam meg, amelyek árnyaltabbá teszik az összehasonlítást és alkalmasak a komplexebb értékelésre: mivel az élő/elhalt és akroszóma értékelés kombinálható a morfológiai értékeléssel, így további informatív kategóriák képezhetők az élő ép sejteken belül. A bírálati rendszer segítségemre volt a mélyhűtési lépések hatásainak elemzésében, illetve a fertilitási gondokkal küzdő mének termékenyítő képesség-csökkenésének hátterében álló probléma felfedésében. A kombinált élő/elhalt és morfológiai elemzés során az élő, ép membránú sejtek morfológiai hiba nélkül és az intakt ondósejtek különböző morfológiai defektusokkal elkülönítésre kerültek. A leggyakrabban előforduló abnormalitásokat (proximális citoplazmacsepp, disztális citoplazmacsepp, középrész- és fark defektus) külön osztályoztam az élő sejteken belül. A további 4 alapkategóriával, amely sejteknél a spermium valamely részén a membrán sérült, összesen 8 kombinált kategóriát alakítottam ki. Az ondósejtek csak morfológiai elemzéssel öt egyszerű, illetve 9 differenciáltabb kategóriába sorolhatók (részletek az Anyag és Módszer fejezetben).

A festési módszer komplexitása biztosítja, hogy az adott célnak megfelelő osztályozást végezzünk. Az élő/elhalt – morfológiával kombinált elemzést általánosságban rutin vizsgálatkor és spermium manipulációs technikák ellenőrzése céljából is megfelelőnek tartom és ajánlom.

5.2 A 2. vizsgálat eredményei szerint egyértelmű, hogy a mélyhűtés/felolvasztás leginkább az ondósejtek farki részét károsítja, fagyasztás után az ondósejtek 57,6%-a mutatott sérült farokmembránt. Tehát a már korábbi felismerések - mint a fej alakjának és méretének fontossága a mélyhűthetőség szempontjából – mellett, a középrész és a fark sérülései is kiemelten fontosak a sperma-fagyasztás során. Az ép feji és fark-membránú, de sérült akroszómájú sejtek aránya alacsonyabb volt a mélyhűtés és felolvasztás után (1,8 %-a az életképes sejteknek) a kombinált fluoreszcens módszerekkel mások által megállapítottnál. Az eltérések az eltérő festési eljárásokkal magyarázhatók, mert a fluoreszcens technikák 1-2 mosással és megnövekedett inkubációs idővel járnak, míg a tripánkék/Chicago sky blue festés a minták gyors hígítása után közvetlenül történik és az akroszóma Giemsa-festését fixálás előzi meg. Egy másik ok a sejt-típusok eltérő osztályozása lehet. A friss, illetve mélyhűtött ménsperma minták egyéni jellegzetességeket mutatnak az élő/elhalt status és a morfológia szempontjából is. A centrifugálásra is egyéni érzékenységet tapasztaltam. A spermiumok az egyes nem letális sokkhatásokra igen jellemzően reagálnak. Hideg- és melegsokknál megfigyelhető a farokrész visszahajlása, vagy feltekeredése a sejtmembrán vízpermeabilitás-változásának hatására. Vizsgálatainkban azt tapasztaltuk, hogy centrifugálás is okozhat a hidegsokkhoz és hipoozmotikus sokkhatáshoz hasonló morfológiai elváltozást és ez a hatás egyes ménenél fokozottan jelentkezett. Az élő sejteken belül a normális morfológiájúak aránya nagyon fontos. A középrész és a fark károsodásainak jelentősége megnövekedhet a fagyasztott spermában, mivel az IBT spermiumok aránya ugyanolyan, vagy akár nagyobb is lehet a normal morfológiájú sejteknél az élő, intakt sejt-kategóriákban. Ez jelentős aránybeli változást jelent és hatással lehet a mélyhűtött sperma a termékenyítő képességére. Ebből a szempontból fontos az abnormális morfológiájú sejtek gyakoriságának vizsgálata az élő sejteken belül. Az érintett mén csoportjában az élő sejteken belül az IBT átlagos aránya 30,3 % volt a mélyhűtött spermában, míg a nem-érintett csoportban 8,6 % volt. Ezek a sejtek később vagy kiszűrődnek a női nemi utakban, vagy nem tudnak áthatolni a zona pellucidán. Ennek alapján a magas IBT arányú sperma fertilitása javítható, ha növeljük a sejszámot a termékenyítő adagban.

Az irodalmi adatok szerint a citoplazma-cseppek meglehetősen gyakoriak a ló spermiumokon. A proximális cseppek (PD) az ejakulált spermiumokon általában here-eredetű defektusra utalnak és szerepük van a bikák és sertéskanok csökkent fertilitásában. A visszamaradt disztális plazmacseppek (DD) hatása a fertilitásra kevésbé ismert, habár újabban úgy vélik, hogy a korábban feltételezettnél károsabbak. Egyes elméletek szerint a plazmacseppek ondósejtek részben kiszűrődnek a női nemi

utakban, de egy részük elérheti a petesejtet, bár feltehetően nem képes a zona pellucidához kötődni, viszont a cseppekben lévő enzimek hatnak az ettől a hibától mentes ondósejtekre is, így a citoplazma-cseppek szemi-kompenzálható defektusnak minősíthetők. A plazmacseppes sejtek magas aránya az épek között a mélyhűtött spermában negatív hatású lehet a fertilitásra.

A mélyhűtött sperma minőségének szempontjából a teljesen ép, életképes spermiumok aránya a legfontosabb. Mindamelllett a mélyhűtési technológiák további fejlesztése céljából, a mének egyedi sperma-mélyhűthetőségének feltérképezése és a fagyasztott sperma felhasználhatóságának szempontjából is fontos a mélyhűtési folyamat során a sejtkárosodás helyének pontos behatárolása, amihez a spermiumok egyes részeinek elkülönített értékelése szükséges. Az alkalmazott festési módszer jól használható az ondósejtek subdomain-specifikus vizsgálatára. Az értékes, ígéretes, vagy ritka fajtákba, vérvonalakba tartozó mének spermájának mélyhűtve-tárolása későbbi felhasználásra, fontos módja a genetikai változatosság megőrzésének. A komplex festési módszer individuálisan is segíthet az optimális sperma-fagyasztási protokoll kiválasztásában. Nagyon hasznos fejlesztés lenne egy számítógépes automatizált technika kidolgozása a festett kenetek értékelésére.

5.3 Alacsony teljes, vagy élő sejtszám esetén a standard spermium szeparációs módszerek nem mindig hatékonyak. A ménspermiumok ezen túl igen érzékenyek az elhúzó eljárásokra. Korábban számos vizsgálatot végeztek a swim-up és a Percoll® szeparáció összehasonlítására, nagyon változatos eredményekkel. Én úgy találtam, hogy a Percoll szeparáció hatékonyabb volt, mint a swim-up. A P-CON és a P-PX voltak a leghatásosabb módszerek, ha alacsony sejtszámmal kellett kezdeni a munkát. A szeparált ép fark-membránú spermiumok (amelyek mozgásra képesek, Nagy és mtsai 1999) 25-35%-ának sérült volt a feje vagy akroszóma membránja. Ez befolyásolhatja az ICSI eljárás sikerét, amelynek során a beinjektálásra kerülő spermium kiválasztása a mozgási képességén alapul a gyakorlatban. Az eredmények rámutatnak ennek a módszernek a gyengeségére, hiszen az ép farkú ondósejtek jelentős részének lehet sérült a feje, vagy akroszómája, így ezek a sejtek funkcionálisan is sérültek lehetnek. A SU-HA kezelés utáni magas spermium-kinyerési arány, de alacsony életképesség (túlélési arány) egyik oka a swim-up kezelés utáni centrifugálás károsító hatása lehet. A PX kedvező hatású, ha a Percoll® szeparáció elhúzódik, de szükséges az akroszóma kiürülést okozó hatásának ellenőrzése és az akroszóma hiány szerepének tisztázása az ICSI-vel létrehozott lóembriók további fejlődésére.

5.4 A 4. vizsgálat eredményei rámutattak az ép membránú, normális morfológiájú ondósejtek azonosításának fontosságára. Ajánlatos ezek arányának figyelembe vétele a termékenyítő adagok sejt számának megállapításánál. Fontos a spermium rendellenességek típusainak meghatározása, mert ezeken alapulhat a további ondómanipulációs módszerek alkalmazása. Amennyiben a rendellenesség kompenzálható (pl. microcephal fej defektus, DMR, hajlott, feltekeredett farkok), a spermium koncentráció megfelelő és 20-30% normális, élő ondósejt is jelen van az ejakulátumban, a termékenyítő dózis sejt számának emelése megoldhatja a problémát. Semi-kompenzálható, vagy nem-kompenzálható defektek esetén, - mint pl. a citoplazma-cseppek magas aránya, ami negatívan befolyásolja a normális sejtek biológiai tulajdonságait és a petesejt termékenyülése után kedvezőtlenül hat a további fejlődési folyamatokra -, a spermiumok szeparálása segíthet a normális, élő ondósejtek izolálásában a defektes sejtektől és az ondóplazmától. A szeparált spermium-szuszpenzió hígítás után hatékonyabban használható mesterséges termékenyítésre azonnal, vagy hűtve szállítás után. A rutin spermaértékelés standard paraméterei (térfogat, sűrűség, összes sejt szám, motilitás és progresszív motilitás) mellett a komplex festési módszer további adalékkal szolgál a friss ejakulátum és a 24-órás hűtve tárolt sperma (eltartási próba) vizsgálatával. A szubfertilis és terméketlen mének felismerésével megelőzhetők a csökkent fertilitási eredmények. A módszert hasznos lenne bevezetni a mének spermájának évenkénti kontroll vizsgálatánál. A csökkent fertilitású egyedek abban az esetben vehetnek részt a tenyésztésben, ha rendkívül magas genetikai értéket képviselnek, kiemelkedő sporteredményekkel rendelkeznek, vagy ha őshonos, vagy kis populációjú fajták génmegőrzése céljából indokoltá válik. Ezekben a speciális esetekben a mén és spermája alapos vizsgálatával, a komplex értékelési módszer alkalmazásával követhetők a spermaminőség változásai és a tenyésztési stratégia ezekhez a változásokhoz igazítható. A szubfertilis mének fokozott tenyésztési menedzsmentje (pl. a spermakezelési eljárások módosítása, centrifugálás, a hígító, vagy a hígítási fok megváltoztatása, a termékenyítő dózisok sejt számának újrakalkulálása, ondósejt szeparálás, a termékenyítendő kancák számának csökkentése, azok figyelmesebb menedzsmentje, a természetes, vagy mesterséges termékenyítés optimális időpontjának meghatározása, és/vagy indukált ovuláció) jobb vemhesülési eredményeket biztosíthat.

6. Új tudományos eredmények

1. Továbbfejlesztettem a Kovács-Foote-féle festési módszert a különböző sejttípusok precízebb megkülönböztetése érdekében: A Chicago sky blue (CSB) festék hasonló spermium fej- és tökéletesebb ondósejt farok élő/elhalt differenciálást eredményezett a tripánkékekhez (TB) képest. Ménsperma esetén a 0,16%-os CSB-vel történő vitális festés utáni 4 perces fixálás és 25-40°C-on, 2-4 órás Giemsa festés ajánlott. Elvégeztem a módosított eljárás validálását: A CSB/Giemsa festés jó ismételhetőséget és magas módszer-egyetértést mutatott a standard TB/Giemsa módszerrel.

2. Kifejlesztettem egy bírálati rendszert, amelyben az élő/elhalt és akroszóma-integritás vizsgálatokat kombináltam a morfológiai analízissel, amelynek során az élő, ép membránú sejtek morfológiai hiba nélkül és az intakt ondósejtek különböző morfológiai defektusokkal elkülönítésre kerültek. A leggyakrabban előforduló abnormalitásokat (proximális, disztális citoplazmacsepp, középrész- és farok defektus) külön osztályoztam az élő sejteken belül. A további 4 alapkategóriával, amely sejteknél a spermium valamely részén a membrán sérült, összesen 8 kombinált kategóriát alakítottam ki. Az új bírálati rendszert sikeresen használtam a spermafagyasztás során létrejövő változások monitorozására és különböző mének gyenge termékenyítő képességének hátterében fellelhető spermium anomáliák kimutatásához. A szubfertilis méneknél minden esetben összefüggés mutatkozott a sperma minőségi paraméterei és csökkent termékenyítőképesége között. Igazoltam, hogy az élő, citoplazma cseppel rendelkező ondósejtek magas aránya negatív hatással van a ménsperma fertilitására. A multiparaméteres spermaértékelési rendszer használatával a szubfertilis és infertilis egyedek kiszűrhetők és a csökkent vemhesülési eredmények okai meghatározhatók.

3. A mélyhűtés folyamatában az összes élő, ép akroszómájú sejtek aránya, ezen belül a normál morfológiájú sejtek rációja a centrifugálás során nem változott, a felolvasztott spermában viszont szignifikánsan csökkent. Az élő sejtek akroszómájának sérülése, illetve leválása nem volt jellemző a fagyasztás után, mivel az IHITDA sejttípus kevesebb, mint 1%-os arányban volt jelen. Egyéni érzékenységet tapasztaltam a centrifugálásra, amely a hideg-, meleg-, hipoozmotikus sokkhoz hasonló ondósejt morfológiai elváltozásokat (hajlott, feltekeredett farokrész) okozott.

4. A Percoll szeparációs eljárást sikeresen módosítottam a médium térfogatának csökkentésével (Mini-Percoll: 0,4 ml 90% és 0,5 ml 45% Percoll 1,5 ml-es mikrocentrifuga csőben), a centrifugálás időtartamának rövidítésével és magasabb g-érték használatával (600 x g 5 percig), hogy növeljem az életképes spermiumok kinyerésének hatékonyságát ICSI-re, kis térfogatú, alacsony sejtkoncentrációjú ménsperma elérhetősége esetén. A spermium szuszpenzió Mini-Percoll-os szeparációja stimuláló vegyületekkel történő inkubáció nélkül (P-CON) és 3,5 mM pentoxifillinnel történő inkubáció után (P-PX) eredményezte a legtöbb morfológiailag normál, intakt spermiumot és a legjobb sejtkinyerési arányt összehasonlítva az 1 mg/ml hiarulonsavas inkubáció utáni mini-percoll eljárással (P-HA) és az összes swim-up kezeléssel. A szeparált, ép farok membránú spermiumok - amelyek mozgásra képesek - 25-35%-ának sérült a feje vagy akroszóma membránja. Ez befolyásolhatja az ICSI eljárás sikerét, amelynek során a beinjektálásra kerülő spermium kiválasztása a mozgási képességén alapul a gyakorlatban. Az ép membránú, de akroszóma-sérült sejtek (IHITDA) aránya P-PX kezelés után volt a legmagasabb. Ezek a spermiumok kiürülőben lévő, vagy már kiürült akroszómát tartalmaznak, ami előnyös lehet az ICSI általi petesejt megtermékenyítés során.

7. Az értekezés témakörében megjelent publikációk

Lektorált szakfolyóiratban megjelent tudományos közlemények

1. **Kútvölgyi G.**, Nagy Sz., Czimber Gy., Balogh A., Stefler J., Kovács A. (2003) *Ménspermiumok élő/elhalt és akroszóma festése; Állattenyésztés és Takarmányozás* 52. 2. 137-143. (magyar nyelvű, angol összefoglalóval).
2. **Kútvölgyi G.**, Stefler J., Kovács A. (2006) *Viability and acrosome staining of stallion spermatozoa by Chicago sky blue and Giemsa*. *Biotech. Histochem.* Vol. 81. (4-6) p.109 – 117. Erratum in: *Biotech. Histochem.* 2007. 82: 45.
3. Morrell JM., Mari G., **Kútvölgyi G.**, Meurling S., Mislei B., Iacono E., Rodriguez-Martinez H. (2011). *Pregnancies following artificial insemination with spermatozoa from problem stallion ejaculates processed by Single Layer Centrifugation with Androcoll-E*; *Reproduction in Domestic Animals*. 46 (4): 642-645.

Előadás és poszter prezentáció hazai és nemzetközi konferencián

1. **Kútvölgyi G.**, Balogh A., Nagy Sz., Czimber Gy., Stefler J., Kovács A. (2003) *Shorter (2 hours) live/dead and acrosome staining of stallion spermatozoa*; *Reproduction in Domestic Animals* 38: p340. Abstract P24. (ESDAR Congress, September 4-6, 2003; Dublin).
2. **Kútvölgyi G.**, Czimber Gy., Nagy Sz., Stefler J., Kovács A. (2004) *An unusual response of spermatozoa to centrifugation in case of an Arabian stallion*; 15th International Congress on Animal Reproduction (ICAR), 2004 August, Porto Seguro, Brazil, Abstracts. Vol 2. p.499.
3. **Kútvölgyi G.**, Suh T., Carnevale E., Seidel G. Jr. (2005) *Use of pentoxifylline and hyaluronic acid for stallion sperm separation*; The 31st Annual Conference of the International Embryo Transfer Society, Copenhagen, Denmark, 8-12 January 2005; Abstr. in: *Reproduction, Fertility and Development*. 17 (1,2) p.310.
4. **Kútvölgyi G.**, Suh T., Carnevale E., Seidel G. Jr. (2005) *Morphologic evaluation after using pentoxifylline and hyaluronic acid for stallion sperm separation*; The 9th Annual Conference of the European Society for Domestic Animal Reproduction (ESDAR), Murcia, Spain, 1-3 September, 2005; Abstract in: *Reproduction in Domestic Animals*. Vol. 40: p407. (Abstract P271).
5. **Kútvölgyi G.**, Reiczigel J., Stefler J., Kovács A. (2006) *Effect of Morinda citrifolia on the membrane integrity of stallion spermatozoa*; 10th International Symposium on Spermatology Madrid, 17-22 September 2006, Abstract in the proceedings: P3-28, p.110.

6. **Kútvölgyi G.**, Czimmer Gy., Nagy Sz., Jancsik V., Kovács A., Stefler J. (2006) *Mén ondósejtek károsodásainak elemzése a mélyhűtési folyamat során; Állatbiotechnológiai kutatások Magyarországon*, MTA konferencia, Budapest, 2006, szeptember 29., Összefoglaló megjelent a konferencia-kiadványban: p.23 (magyar nyelvű előadás).
7. Horváth A., **Kútvölgyi G.**, Molnár M., Pribenszky Cs., Harnos A., Szenci O. (2007) *A magas hidrosztatikai nyomás alkalmazása a ménondó mélyfagyasztási protokolljában*; 14. Szaporodásbiológiai Találkozó. 2007. október 5. Keszthely. (magyar nyelvű prezentáció Horváth A. előadásában, Összefoglaló a konferencia-kiadványban).
8. Mari G., Iacono E., **Kútvölgyi G.**, Mislei B., Rodriguez-Martinez H., Morrell JM. (2010) *Stallion spermatozoa prepared by single layer centrifugation with androcollTM-E are capable of fertilization in vivo*; (Poster presentation at ESDAR 2010, Eger, Hungary) Abstract in: *Reproduction in Domestic Animals* 45. supplement 3., p.97.

8. Irodalom

1. Bland JM, Altman DG. 1986. Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement. *Lancet* i 8476: 307–310.
2. Domes U. 2003. Untersuchungen über die Bestimmung der Spermaqualität - insbesondere Motilität und Membranintegrität – und Zusammenhänge zur Fertilität von Besamungshengsten. Inaugural Dissertation zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München.
3. Kovács A, Foote RH. 1992. Viability and acrosome staining of bull, boar and rabbit spermatozoa. *Biotech. Histochem.* 67: 119-124.
4. Lillie RD. 1977. H. J. Conn's Biological Stains, 9th ed., Williams & Wilkins Co., Baltimore. pp. 158-163.
5. Nagy Sz, Házás G, Bali Papp Á, Iváncsics J, Szász F, Szász F Jr, Kovács A, Foote RH. 1999. Evaluation of sperm tail membrane integrity by light microscopy. *Theriogenology* 52: 1153-1159.
6. Nagy Sz, Jansen J, Topper EK 2003. Validation of a light microscopic analysis of bull sperm quality by flow cytometry. *Reprod. Dom. Anim.* 38. No 4. p334. Abstract P3.
7. Tartaglione CM, Ritta MN. 2004. Prognostic value of spermatological parameters as predictors of in vitro fertility of frozen-thawed bull semen. *Theriogenology* 62: 1245-1252.
8. Vidament M, Ecot P, Noue P, Bourgeois C, Magistrini M, Palmer E. 2000. Centrifugation and addition of glycerol at 22° C instead of 4° C improve post-thaw motility and fertility of stallion spermatozoa. *Theriogenology* 54: 907-919.