

RÖVID KÖZLEMÉNY/SHORT COMMUNICATIO

**SERTÉS IN VITRO FERTILIZÁCIÓHOZ HASZNÁLT
MELLÉKHERE EREDETŰ SPERMIMUMOK HŐTŰRÉSI STRESSZ
VIZSGÁLATA KÜLÖNBÖZŐ TÁPFOLYADÉKOKBAN***

MAGYAR ANDREA - ESSŐ ZSUZSANA - EGRSZEGI ISTVÁN - BODÓ SZILÁRD

ÖSSZEFOGLALÁS

A különféle okokból, váratlanul elpusztult, de genetikai szempontból értékes kanoktól származó hímivarsejtek megővésének egyik módja az egyedek mellékhere eredetű (MH) spermiumainak mélyhűtése. A lefagyasztott, majd felolvasztott MH spermiumok egyik alkalmazási területe az „in vitro fertilizációs” kísérletekben való felhasználás, amelyhez szükségszerű a jó minőségű spermium. A vizsgálatok célja az volt, hogy a felolvasztás után megállapítsák a MHS motilitásában, valamint feltételezett termékenyítő képességében bekövetkező változásokat, valamint, hogy kiválasszák a túlélést legjobban támogató pufferközeget. A spermiumok életképességét hőtüresi stressz próbával, a feltételezett termékenyítőképességet Kovács-Foote festéssel vizsgálták. Az eredmények segítségével nagyfokú javulást érhettek el az in vitro fertilizációs kísérleteik során.

SUMMARY

Magyar, A. - Esső, Zs. - Egerszegi, I. - Bodó, Sz.: HEAT TOLERANCE TEST OF PIG EPIDIDYMAL SEMEN IN DIFFERENT SOLUTIONS

One way of conserving male sperm from unexpectedly died but genetically valuable boar is the cryopreservation of epididymal semen. Frozen/thawed sperm are used in “in vitro fertilization” experiments for which high quality sperm is required. The aim of the investigations was to determine the changes in sperm motility and presumptive fertility and select the best buffer solution for supporting the survival of sperm cells. Heat tolerance test was used to evaluate the viability and Kovacs-Foote staining was applied to determine the presuming fertility of the cells. Using the results of the analysis it is possible to increase the efficacy of in vitro fertilization.

*A közlemény a XXIII. Szaporodásbiológiai Találkozón (2017. október 14., Cegléd) elhangzott előadás bővített változata

BEVEZETÉS

A kan sperma életképességének hosszútávú tárolása a mesterséges termékenyítés fejlődésével a nagy értékű tenyészállatok genetikai anyagának megőrzésére nélkülözhetetlenné vált. Az 1950-es évek második felétől a sperma mélyhűtési eljárások fejlődése robbanásszerűen megnövekedett és a napjainknak használt módszerek alapjai már az 1970-es évekre többé-kevésbe ki lettek dolgozva. A sikeres mélyhűtés mellett fontos volt, hogy a felolvasztást követően a sejtek termékenyítőképeseek maradjanak, ezért számos spermakezelési és értékelési módszert fejlesztettek ki az évtizedek során (Makkosné és mtsai 2008).

Lehetőség nyílt a mellékheréből történő spermiumok kinyerésére és mélyhűtésére, amely lehetővé teszi a hirtelen elhullott értékes tenyészállatok post mortem genetikai anyagának megőrzését is. A mélyhűtött/ felolvasztott sertés MH spermiumokat az in vitro fertilizáció (IVF) során alkalmazzák termékenyítő anyagként. Több vizsgálat arra utal, hogy jobb a fagyasztás káros hatásaival szembeni ellenálló képességük és a termékenyítéshez szükséges kapacitációs folyamat is kedvezőbbben megy végbe az ejakulált spermiumokhoz képest in vitro (Cheng és mtsai, 1986; Losley és mtsai, 1944, Suzuki és mtsai, 2005).

A munkánk során azt vizsgáltuk, hogy a mélyhűtött MH spermiumok a felolvasztást követően megfelelő motilitással és feltételezett termékenyítőképességgel rendelkeznek-e, és ezt milyen tápközeg biztosítja a legjobban az ivarsejtek számára. Kísérleteinkben ezért az IVF-nek megfelelő környezet biztosításával hőtűrési stresszpróbát végeztünk.

ANYAG ÉS MÓDSZER

A kísérleteinkhez tenyészérett mangalica kanok ivartalanításából származó mellékheréből kinyert mélyhűtött/felolvasztott spermiumait használtunk (Egerszegi és mtsai, 2012). A sejtkoncentrációt Makler-kamra segítségével határoztuk meg.

A sertés in vitro fertilizációs kísérletekben is használt különböző tápoldatokban: PGM (Yoshioka és mtsai, 2008), PFM és SP-WASH (Kikuchi és mtsai, 1998). vizsgáltuk a spermiumok tulajdonságait.

A hőtűrési stresszpróbát (Heat Tolerance Test - HTT), 3 órás időintervallumban, 38,5°C-on 5 % CO₂ és 5% O₂ gázelegyenben történő inkubálással végeztük az in vitro fertilizációs körülmények modellezésére. A mintákat a felolvasztást követően minden esetben két kezelési csoportra osztottuk. Az első esetben centrifugálással (760g 2 percig) eltávolítottuk a krioprotektáns anyagokat és a felülúszó leszívását követően a visszamaradó pelletet a megfelelő arányban hígítottuk. A második esetben a mintákat az olvasztást követően a mosási lépés kihagyásával hígítottuk.

Az első kísérletünkben rendelkezésünkre álló 5 mellékhere eredetű sperma kevert mintája került felhasználásra eltérő hígítási arányban (10x, 20x, 50x, 100x), a különböző tápfolyadékokban (P-FM, PGM, SP-WASH). A kísérlet során óránként szubjektív módszerrel fáziskontraszt mikroszkóp segítségével 200x nagyításon meghatároztuk a sejtek motilitását.

Ezt követően az egyedi különbségek meghatározására az 5 különböző sperma mintán megismételtük a vizsgálatainkat az előző kísérletben legjobbnak bizonyult oldatban. Az óránként elvégzett szubjektív motilitás vizsgálatot kiegészítettük

Kovács-Foote festéssel (Kovács és Foote 1992), hogy megállapítsuk az élő-elhalt sejt arányt, valamint az akroszóma sérülések mértékét, amivel meghatároztuk a feltételezetten termékenyítőképes spermiumok arányát. A kenetek kiértékelését fáziskontraszt mikroszkóppal 400X nagyításon és a Hamupipőke 2.0 program segítségével végeztük.

EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK

Első kísérletünkben a kevert mintákkal PFM, SP-WASH és PGM oldatban 10x, 20x, 50x, 100x hígításában hőtűrési stresszpróbát végeztünk. Ezalatt azt tapasztaltuk, hogy a centrifugáláson átesett minták szubjektív motilitása jelentősen csökkent mind a kezdeti, mind a hígított mintákhoz képest.

A centrifugálás nélkül hígított minta eredményei alapján megállapítható, hogy 1 óra elteltével a PFM és a PGM oldatban 100x hígításban volt a legjobb a sejtek motilitása, míg a SP-WASH oldatnál a 10x hígítás mutatkozott a legjobbnak. A második órától az oldatokban a spermiumok agglutinációja volt megfigyelhető, amely megnehezítette a szubjektív motilitás megállapítását is. Két és 3 óra elteltével a PFM és a SP-WASH oldatok esetén jelentősen csökkent a sejtek motilitása, és az ivarsejtek agglutinációjának mértéke jelentősen megnövekedett. 3 óra elteltével a PGM oldatban a sejtek szintén kisebb csomókba rendeződtek, de ennek ellenére is ebben az oldatban mutatták a legjobb motilitást. PGM oldat hígítási mértékei közül a 100x hígítás mutatkozott a legeredményesebbnek a 3. óra végén. (1. ábra)

Második kísérletünkben a rendelkezésre álló 5 mellékherei spermium mintát teszteltük le a hőtűrési stresszpróbával, egyedi különbségeket keresve az előzőekben legjobbnak bizonyult oldatban (PGM 100x hígítás).

Ez esetben nem találtunk jelentős különbséget az egyedi minták minőségcsökkenése alapján, de elmondható, hogy a centrifugálás az előző kísérletben tapasztaltakhoz hasonlóan nagymértékben csökkentette itt is a mozgó sejtek arányát.

Óráként mintát vettünk a Kovács-Foote festés számára. Meghatároztuk az élő, ép akroszomával és farokmembránnal rendelkező sejtek arányát. A centrifugált, és a hígított kezelési csoportnál látszik, hogy az idő előrehaladtával fokozatos csökkenés tapasztalható a feltételezhetően termékenyítőképes sejtek arányában.

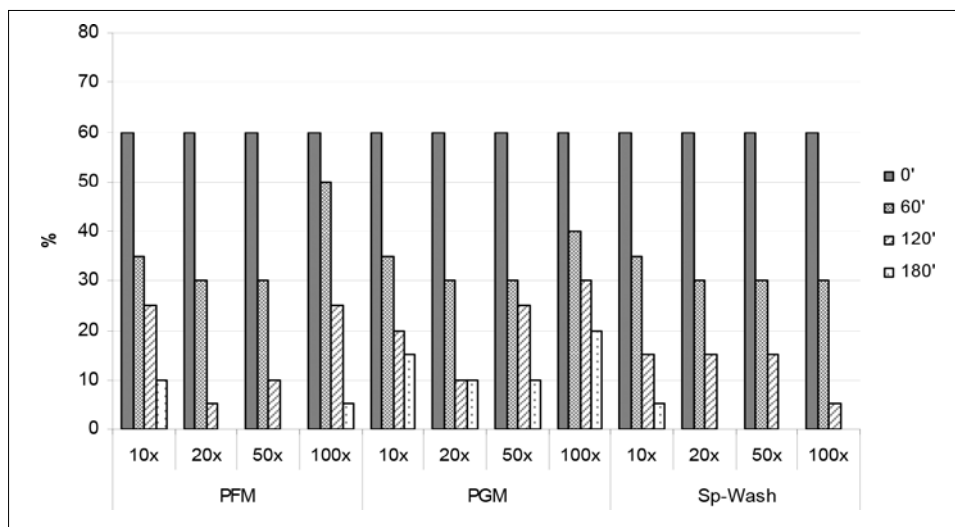
Az első kísérleti csoportban a hígított minták esetében 3. óra elteltével a mintákban az élő sejtek aránya 20% körüli értéket mutatott. Míg a második kísérleti csoportban, azaz a centrifugálást követően hígított mintáknál ez az arány a 20%-ot sem éri el a 3. órát követően.

Valamint itt is jól látható, hogy a centrifugált minták rosszabb eredményt mutattak (3. ábra).

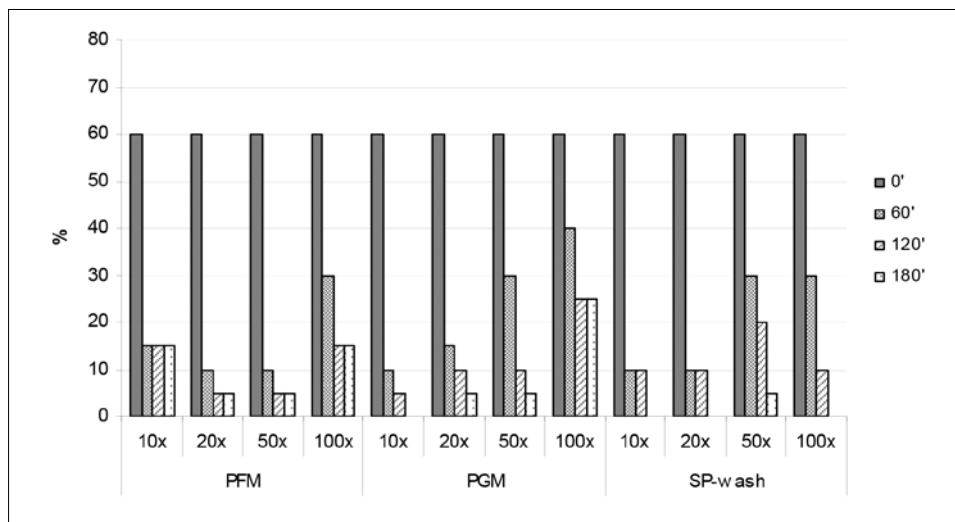
KÖVETKEZTETÉSEK

A 3 órás HTT végére a minták minősége mindhárom tápfolyadékban jelentősen csökkent. A Kovács-Foote féle festés eredményei alapján elmondható, hogy a centrifugálás minden esetben jelentős minőségi romlást okozott, amit a szubjektív motilitás elemzés azonban nem mutatott ki, ezért javasolható, hogy az IVF során

1. ábra A kevert spermiumminta szubjektív motilitás vizsgálata 10x, 20x, 50x, 100x hígítású PFM, SP-WASH és PGM oldatban 3 óra HTT során



(1) centrifugálás nélkül

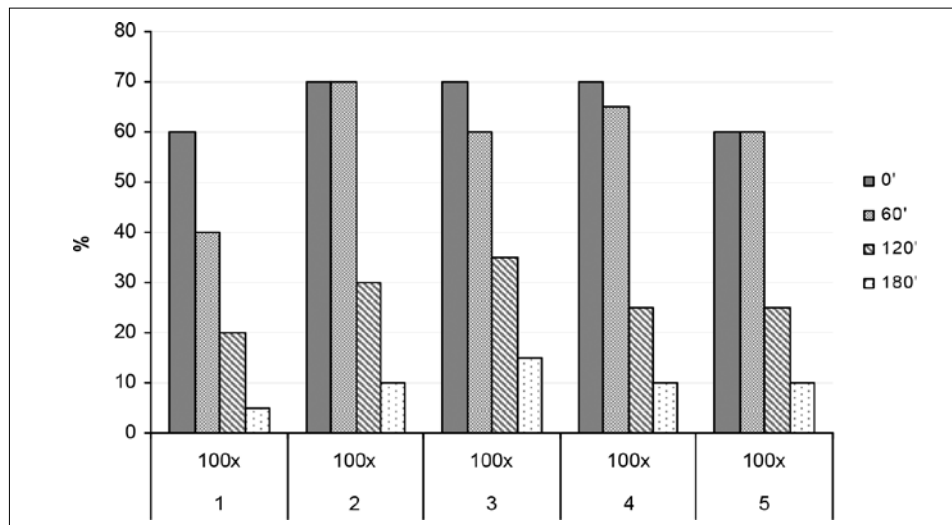


(2) centrifugált minták

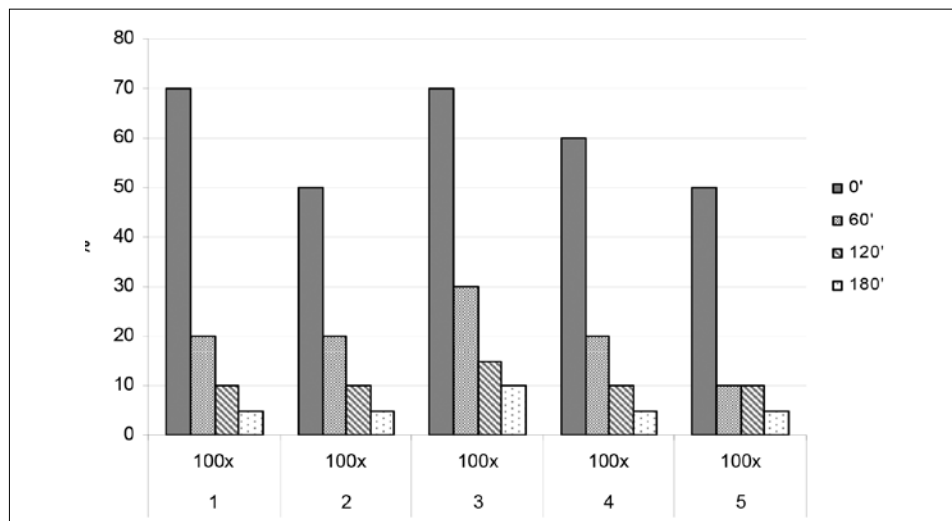
Figure 1. The Heat Tolerance Test of the mixed sperm sample in 10x, 20x, 50x, 100x diluted, PFM, SP-WASH and PGM solutions at 3 hrs of HTT

(1) centrifuged and (2) not centrifuged

2. ábra Egyedi spermium minták szubjektív motilitás vizsgálata 100x hígítású PGM oldatban 3 óra HTT során



(1) centrifugálás nélkül

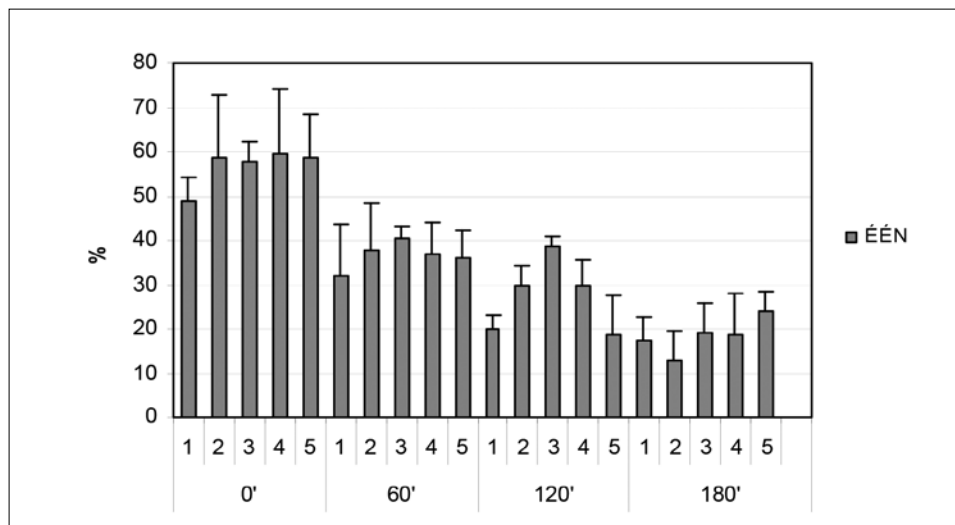


(2) centrifugált minták

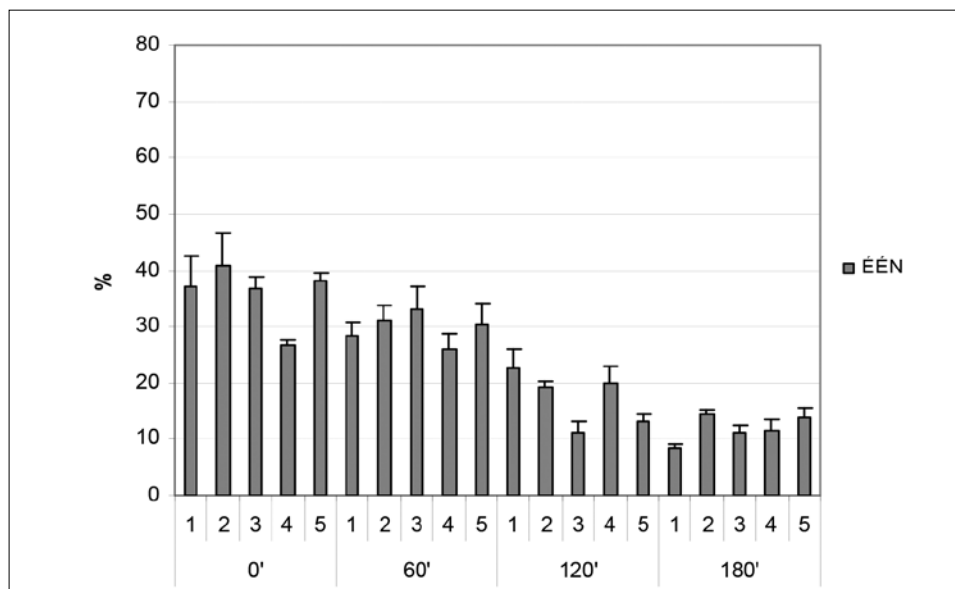
Figure 2. Subjective motility test for individual sperm samples in 100x diluted PGM solution at 3 hrs of HTT

(1) centrifuged and (2) not centrifuged

3. ábra Kovács-Foote festés: élő, ép akroszómájú, ép farokmambránú sejtek arányának változása 5 MH spermium mintán 3 óra HTT során



(1) centrifugálás nélkül



(2) centrifugált minták

Figure 3. Kovács-Foote staining: changing of ratio of live sperm cells for 5 individual sperm samples at 3 hrs of HTT

(1) centrifuged and (2) not centrifuged

használni kívánt termékenyítő anyag kiválasztása előtt végezzünk hőtűrési próbát és a szubjektív motilitási megfigyelést egészítsük ki a membrán károsodást kimutató Kovács-Foote festést is. Az IVF során termékenyítőközegként használt PGM puffer alkalmazását javasoljuk.

Érdeemes lenne a centrifugálás okozta minőségromlás feltárására (a fordulatszám és az időtartam arányának változtatása), valamint az eltárolt termékenyítő anyag homogenitásának megállapítására (egy mélyhűtött MHS minta több műszalmájának vizsgálata) további kísérleteket végezni.

Köszönetnyilvánítás

NAIK ÁTHK/MBK KFI: Sertés petesejtek mélyhűtése vitrifikációs eljárással, embriótenyésztés fejlesztése az ex situ in vitro génmegőrzés a jövőbeni gazdasági hasznosítás megalapozásához és a 11476-3/2016/FEKUT

IRODALOMJEGYZÉK

- Cheng, WTK – Moor, R. – Polge, C (1986): In vitro fertilization of pig and sheep oocytes matured in vivo and in vitro. *Theriogenology*, 25. 146.
- Egerszegi I. – Sarlós P. – Csík J. – Wahner C. – Tóth P. – Somfai T. – Nagai T. – Rátky J. – Kikuchi K. (2012): Epididymal semen cryopreservation from Mangalica boars: Dagene Annual Meeting In: Dagene Annual Meeting. Konferencia helye, ideje: Ausztria, 2012.08.30-2012.08.31.
- Kikuchi, K. – Nagai, T. – Kashiwazaki, N. – Ikeda, H. – Noguchi, J. – Shimada, A – Soloy, E – Kaneko, H. (1998) Cryopreservation and ensuing in vitro fertilization ability of boar spermatozoa from epididymides stored at 4°C, *Theriogenology*, 50. 615-623.
- Kovács A. – Foote RH (1992): Viability and acrosome staining of bull, boar and rabbit spermatozoa. *Biot. Histoc.*, 67. 119-124.
- Losley, JF – Bogart, R. (1944): A comparative study of epididymal and ejaculated spermatozoa of the boar. *J. Anim. Sci.*; 3. 360-370.
- Makkosné Petz B. – Kiss R. – Bali Papp Á. (2008): A kansperma tárolásának történeti áttekintése. *Acta Agraria Kaposváriensis*, 12. 1. 91-106.
- Suzuki, C – Yoshioka, K – Itoh, S – Kawarasaki, T – Kikuchi, K (2005): In vitro fertilization and subsequent development of porcine oocytes using cryopreserved and liquid-stored spermatozoa from various boars. *Theriogenology*, 64. 1287-1296.
- Yoshioka, K – Suzuki, C – Onishi, A (2008) Defined system for in vitro production of porcine embryos using a single basic medium. *J. Reprod. Dev.* 54. 208–213.

Érkezett: 2018. június

Szerzők címe: Magyar A. - Esső Zs. - Egerszegi I. - Bodó Sz.
Szent István Egyetem, Mezőgazdaság- és Környezettudományi Kar
Author's address: Szent István University, Faculty of Agricultural and Environmental Sciences
H-2100 Gödöllő, Páter Károly u. 1.
magyar.andrea@athk.naik.hu