

DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

NYUGAT-MAGYARORSZÁGI EGYETEM
MEZŐGAZDASÁGTUDOMÁNYI KAR, MOSONMAGYARÓVÁR

Állattenyésztési Intézet

Programvezető és témavezető:

DR. DR. h.c. IVÁNCICS JÁNOS

az MTA doktora

KÜLÖNBÖZŐ FAJTÁJÚ TENYÉSZBIKÁK TERMÉKENYÍTŐANYAGÁNAK CITOLÓGIAI VIZSGÁLATAI

Készítette:

NAGY SZABOLCS TAMÁS

MOSONMAGYARÓVÁR

2001

1. A KUTATÁS ELŐZMÉNYEI, CÉLKITŰZÉS

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

A komplex spermabírálat egy lehetséges módja a Kovács és Foote által kidolgozott élő/elhalt+akroszómafestési eljárás (Biot Histoc 67: 119-124., 1992).

A dolgozatban foglalt kísérletek célkitűzései az alábbiak voltak:

- A Kovács-Foote féle vitális + akroszómafestés alkalmazhatóságának vizsgálata a spermiumok farokmembránjának értékelése szempontjából.
- A farokfestődés és a motilitás közötti összefüggések vizsgálata.
- Az élő/elhalt+akroszómafestés összehasonlítása flow citométeres vizsgálatokkal.
- Rutinszerűen alkalmazható flow citometriás festési eljárás kidolgozása tojássárgája-tartalmú hígítóban feldolgozott sperma-minták értékelésére.

2. ANYAG ÉS MÓDSZER

2.1. A farokfestődés vizsgálata hipoozmotikus közegben

A vitális festés és a HOS kombinációjaként Kovács és Foote (1992) módszerét követtük azzal a módosítással, hogy a hipoozmotikus reakció kiváltása érdekében 30 mosmol/l – hipoozmotikus tripánkék-oldatot használtunk. A keneteket 400x nagyítással, fénymikroszkóp segítségével értékeltük.

2.2. Farokfestődés összehasonlítása számítógépes motilitási eredményekkel

2.2.1. Membránintegritás-vizsgálat

A felolvasztott spermamintákból festett keneteket készítettünk Kovács és Foote (1992) módszere szerint. A keneteket fénymikroszkóppal értékeltük 400x nagyítással, kenetenként 200-200 sejtet megszámlolva és a spermiumfej, farok, illetve akroszóma membránállapota alapján osztályozva.

2.2.2. Számítógépes motilitásvizsgálat

A mozgó spermiumok százalékos arányát (MOT%) HTM 2000 típusú motilitásvizsgáló berendezés (Hamilton Thorne Research, Beverly, MA, USA) segítségével állapítottuk meg.

2.3. Fénymikroszkópos és flow citométeres membránintegritás-vizsgálatok összevetése

2.3.1. Fénymikroszkópos értékelés

A spermamintákból keneteket készítettünk Kovács-Foote (1992) módszere szerint.

2.3.2. Flow citometria

A méréseket FACSCalibur flow citométerrel (Becton Dickinson, San José, CA, USA) végeztük. Mintánként 10 000 FITC-PNA/PI-vel festett sejt fluoreszcens adatait gyűjtöttük össze és analizáltuk citogram formában.

2.4. Flow citométeres membránintegritás-vizsgálatok új festékkombináció segítségével

A FITC-PNA/PI-dal festett minták esetében 10 000 "Spermium" eseményt, az SYBR-14/PE-PNA/PI (SPP)-festett minták esetében 10 000 "Spermium ÉS NEM hígító" eseményt rögzítettünk és elemeztünk.

Az SPP módszer precizitásának vizsgálatára 10 bika két-két ejakulátumát vizsgáltuk. A rutinszerűen feldolgozott és fagyasztott/felolvasztott termékenyítőanyagokból 3-3 műszalmát futtattunk le, két ismétlésben.

A tojássárgájának köszönhető mérési torzítás mértékének megállapítására az "élő, ép akroszómájú" spermium-szubpopulációban FITC-PNA/PI festés használata esetén, 14 fagyasztott/felolvasztott spermamintán méréspárokat végeztünk FITC-PNA/PI és SPP festéssel. A méréseket felolvasztás után azonnal ("0 óra") és 37°C-on három órás inkubációt követően ("3 óra") végeztük.

3. EREDMÉNYEK

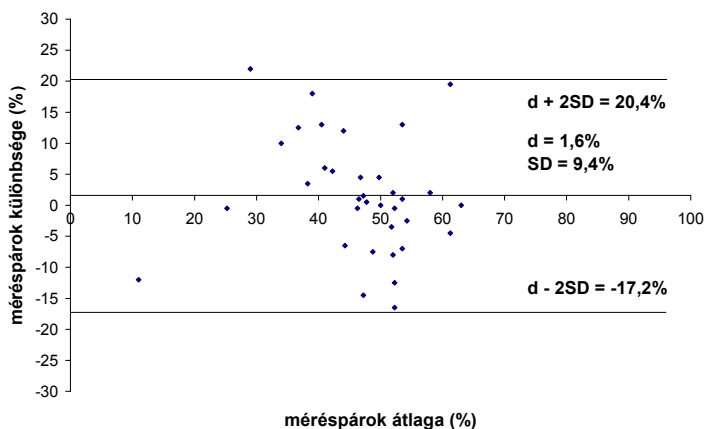
3.1. A farokfestődés vizsgálata hipoozmotikus közegben

A festett farkú ondósejtek és a hipoozmotikus sokkra nem reagáló spermiumok között bikák és kosok esetében a kapott korrelációs koefficiensek ($r = 0,81$, illetve $0,94$, $p < 0,05$) voltak, hasonló tendencia volt észlelhető ($p > 0,10$) a vizsgált kanok esetében is: $r = 0,85$.

3.2. Farokfestődés összehasonlítása számítógépes motilitási eredményekkel

3.2.1. Módszer-egyetértési analízis

A CASA/mikroszkópos méréspárok közötti átlagos eltérés $d = 1,6\%$, a szórás $SD = 9,4\%$, a 95%-os egyetértési határok $d \pm 2SD = (-17,2; 20,4)\%$ voltak (1. ábra).

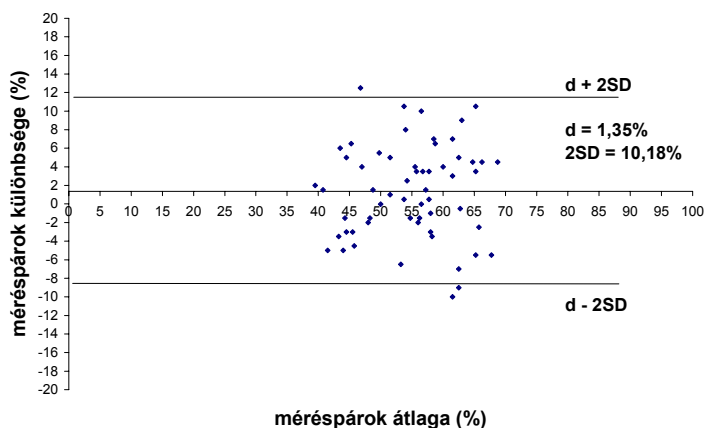


1. ábra. A számítógépes motilitásvizsgálat és a Kovács-Foote festés módszer-
egyértékes vizsgálata. Mérés párok különbségei az átlaguk függvényében.

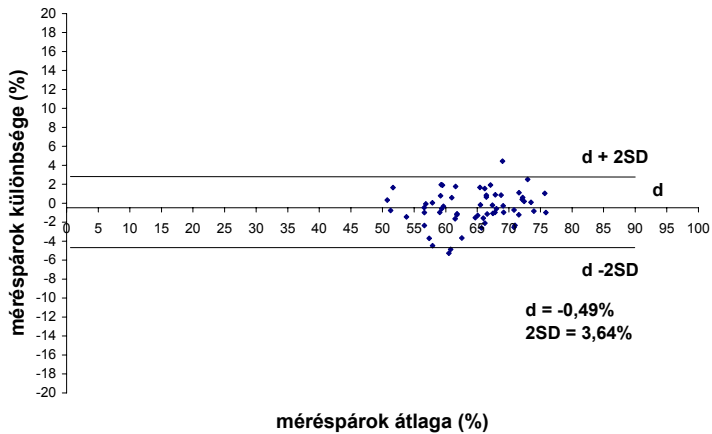
3.3. Fénymikroszkópos és flow citométeres membránintegritás-vizsgálatok összevetése

3.3.1. Ismételt mérési vizsgálatok

A festett kenetek ismételt mérései közötti átlagos eltérés $d = 1,35\%$, a szórás $SD = 5,09\%$, a British Standard ismételt mérési együttható $2SD = 10,18\%$ volt (2. ábra).



2. ábra. Kovács-Foote festés ismételt mérési vizsgálata.

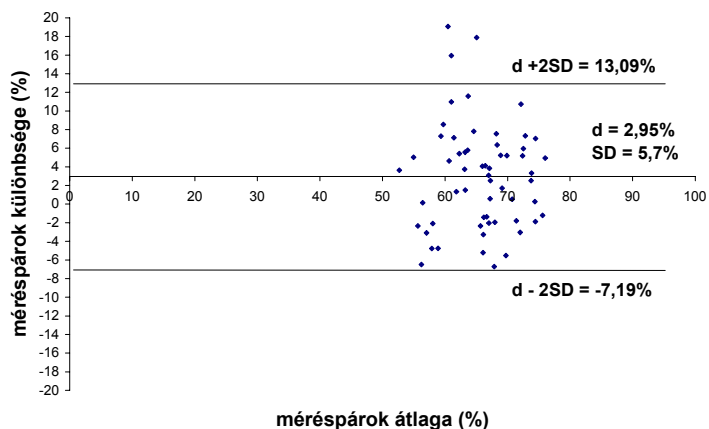


3. ábra. FITC-PNA/PI festés ismételt mérési vizsgálata.

A flow citométeres ismételt mérések közötti átlagos eltérés $d = -0,49\%$, a szórás $SD = 1,82\%$, a British Standard Institution ismételt mérési együtési koefficiens $2SD = 3,64\%$ volt (3. ábra).

3.3.2. Módszer-egyetértési analízis

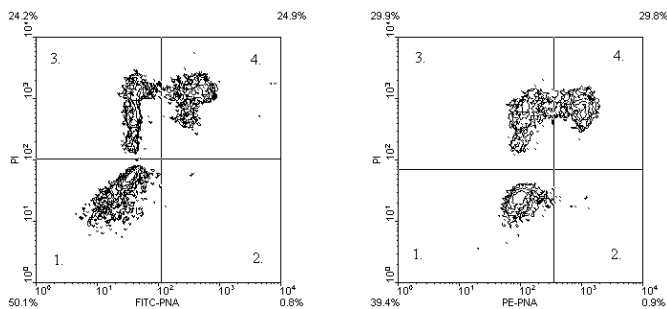
A Kovács-Foote – FITC-PNA/PI mérési párok közötti átlagos eltérés $d = 2,95\%$, a szórás $SD = 5,7\%$, a 95%-os egyetértési határok $d \pm 2SD = (-7,19\%; 13,09\%)$ voltak (4. ábra).



4. ábra. A Kovács-Foote festés és a FITC-PNA/PI festés módszer-egyetértési vizsgálata.

3.4. Flow citométeres membránintegritás-vizsgálatok új festékkombináció segítségével

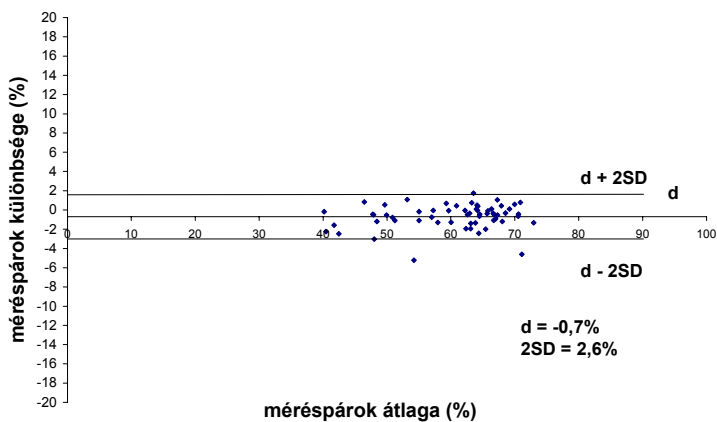
Mind a FITC-PNA/PI, mind az SPP citogramokon négy - négy kvadránst különböztettük meg (5. ábra)



5. ábra. FITC-PNA/PI, illetve SPP 3D citogramok. Az alábbi kvadránsok a következő spermium-szubpopulációknak felelnek meg:

1. " élő sejtek ép akroszómával"
2. "élő sejtek sérült/reaktált akroszómával"
3. "elhalt sejtek ép akroszómával"
4. "elhalt sejtek sérült/reaktált akroszómával"

A flow citométeres SPP-mérések ismétlései közötti átlagos eltérés $d = -0,7\%$, a szórás $SD = 1,3\%$, a British Standard Institution ismételhetségi index $2SD = 2,6\%$ volt, nagyfokú ismételhetséget jelezve (6. ábra).



6. ábra. Az ismételt SPP mérés párok különbségei az átlaguk függvényében

Az összes mérés pár (0 óra és 3 óra) együttes értékelése azt mutatja, hogy a FITC-PNA/PI festékkombinációval átlag 6,3%-al becsüljük túl az élő, ép akroszómájú spermiumok arányát (d átlagos eltérés = 6,33%, szórás $SD = 4,65\%$). A 0, illetve 3 óra inkubáció után végzett mérések külön elemzésekor kitűnt, hogy a FITC-PNA/PI módszer torzítása nagyobb inkubáció után ($d_{0\text{óra}} = 4,21\%$, $d_{3\text{óra}} = 8,44\%$).

4. ÚJ KUTATÁSI EREDMÉNYEK

1. Igazoltam, hogy az ép feji membránú, festett farkú ondósejtek funkcionális szempontból nem tekinthetők élőknek.
2. Elvégeztem a Kovács-Foote-féle spermafestési módszer műszeres (számítógépes motilitásvizsgáló berendezés, flow citométer) validálását. A festés elfogadható egyezést mutatott a motilitásvizsgálatokkal, valamint a citométeres értékeléssel, továbbá mikroszkópos vizsgálatokhoz képest jó ismételhetőségi értékeket kaptunk.
3. Kidolgoztam egy hígított sperma vizsgálatára is alkalmas új, gyors és egyszerű fluoreszcens, flow citométerrel értékelhető festési eljárást.

5. JAVASLATOK

A friss bikasperma feldolgozhatóságának eldöntésére a szubjektív, vizuális motilitásvizsgálat továbbra is megfelelőnek tekinthető. A feldolgozott, mélyhűtött, felolvasztott sperma minőségét azonban érdemes több szempontból is megvizsgálni. Multiparaméteres módszerrel szűrőpróbaszerűen végzett vizsgálatokkal ellenőrizhetőek a feldolgozási folyamat egyes lépései is, így meghatározhatók az adott technológia kritikus pontjai.

Első lépésként hasznosnak tartanám egy kifejezetten állattenyésztési/szaporodásbiológiai flow citométer-laboratórium felszerelését, ahol egyfelől alapkutatási kérdések megoldása lehetne cél, másfelől rutinvizsgálatok is végezhetőek lennének a mesterséges termékenyítő állomások igényei szerint (például új technológia – hígító, mélyhűtő berendezés, stb – bevezetése esetén). A vizsgálatok természetesen kiterjeszhetőek lennének más állatfajokra is.

6. AZ ÉRTEKEZÉS TÉMAKÖRÉBEN MEGJELENT TUDOMÁNYOS KÖZLEMÉNYEK, ELŐADÁSOK JEGYZÉKE

1. Tudományos közlemények

1.1. Magyar nyelven megjelent közlemények

- Iváncsics János – Nagy Szabolcs: Különböző fajtájú bikák spermium-defektusainak vizsgálata (előzetes közlemény) – Acta Agronomica Óváriensis, 1997., vol. 39., Num. 1-2., 67-75.
- Iváncsics János – Nagy Szabolcs: Különböző fajtájú bikák ondósejtjeinek ivari dimorfizmus-vizsgálata (előzetes közlemény) – Acta Agronomica Óváriensis, 1997., vol. 39., Num. 1-2., 77-91.

1.2. Idegen nyelven megjelent közlemények

- Sz. Nagy, G. Házás, Á. Bali Papp, J. Iváncsics, F. Szász, F. Szász Jr., A. Kovács and R.H. Foote: Evaluation of sperm tail membrane integrity by light microscopy – Theriogenology, 1999., 52:1153-1159.
- Sz. Nagy, A. Kovács, T. Zubor, Z. Zomborszky, J. Tóth and P. Horn: Evaluation of frozen/thawed deer spermatozoa: short communication – Acta Veterinaria Hungarica, 2001, közlésre elfogadva

2. Konferencia-kiadványok ban megjelent összefoglalók:

- Nagy Szabolcs – Házás Gábor: Magyar szürke bika mélyhűtött spermájának mikroszkópos értékelése – IV. Nemzetközi Környezetvédelmi Szakmai Diákkonferencia, Mezőtúr, 1998. július 1-3. 39. old.
- Bakainé Kelemen L. - Nagy Sz. - Bali Papp Á. - Iváncsics J.: A tárolás hatása a kansperma életképességére és az akroszóma integritására. XXVII. Óvári Tudományos Napok: Új kihívások a mezőgazdaság számára az EU-csatlakozás tükrében. Mosonmagyaróvár, 1998. Állattenyésztési Szekció I. köt. 208-212. p.
- Sz. Nagy, G. Házás, Ágnes Bali Papp, A. Kovács and J. Iváncsics: Stained sperm tails: dead or alive? – Association for Applied Animal Andrology, Inaugural Meeting, 23-24 November, 1998., Herceghalom, Hungary, p. 21.
- Sz. Nagy, Á. Bali Papp, P. Sarlós, Gy. Gábor, J. Iváncsics and A. Kovács: The tale of the tail – IV. International Conference on Boar Semen Preservation, 8-11 August, 1999., Beltsville, MD, USA, p. 14.
- A. Bali Papp, Sz. Nagy, J. Iváncsics, A. Kovács, T. Pecsí and J. Dohy: Comparison of viability and acrosome status of boar spermatozoa frozen in mini or maxi straws - 50th Annual Meeting of EAAP, 22-26 August, 1999., Zurich, Switzerland, p.126
- Kovács A., Nagy Sz., Dohy J., Iváncsics J., Gergátz E., Szász F., Merész L., Szalai G., Révay T., P. Tardy E., Tóth A., Gustavsson, I. és Lindblad, K.: Kísérletek garantáltan ivarorientált sperma

- előállítására. Kitérés Pontok a Magyar Állattenyésztésben – tudományos konferencia. Budapest, 1999. november 24. Állattenyésztés és Takarmányozás, 48:654-655.
- Nagy Sz., Kovács A., Szász F., Merész L., Sinkovics Gy. és Iváncsics J.: A rutin spermavizsgálatok fejlesztési lehetőségei. Kitérés Pontok a Magyar Állattenyésztésben – tudományos konferencia. Budapest, 1999. november 24. Állattenyésztés és Takarmányozás, 48:660.
 - Sz. Nagy, L. Merész, J. Várszegi, F. Szász, J. Iváncsics and A. Kovács: Relationship between sperm membrane integrity and motility. 26th Annual Conference of the International Embryo Transfer Society, Maastricht, the Netherlands, January 8-12, 2000. Theriogenology, 53:204 abstr.
 - A. Kovács, R.H. Foote, Sz. Nagy, A. Boersma, W. Leidl, R. Stolla and U. Domes: Live/dead and acrosome staining of stallion spermatozoa. 14th International Congress on Animal Reproduction, 2-6 July 2000, Stockholm, Sweden, p.82.
 - Bodó, Sz., Nagy Sz., Baranyai, B., Gócza, E., Kovács, A.: Bull sperm quality evaluated with differential staining before and after swim up. International Conference of Reproductive Biology, Stará Lesná, Slovakia, September 1-3, 2000.
 - Sz. Nagy, X. Qi, J. Han, A. Kovács: Light microscopic investigations on frozen/thawed yak semen – a pilot study. Third International Congress on Yak (ICY), Lhasa, China, September 4-9, 2000. (félkért előadás)
 - T. Révay, X. Qi, E. P. Tardy, Sz. Nagy, J. Han, A. Kovács, A. Tóth, A. Salgó: Experiments on sexing yak spermatozoa by fluorescent in situ hybridization using bovine Y-chromosome specific DNA probe. Third International Congress on Yak (ICY), Lhasa, China, September 4-9, 2000. (félkért előadás)
 - Bodó Sz., Nagy Sz., Baranyai B., Somfai T., Gócza E., Kovács A.: Spermaminőség jellemzése swim up előtt és után. Állattenyésztés és Takarmányozás, 2000. 49. 6. 581-583.
 - Nagy Sz.: Experiences in multicolor flow cytometric sperm analysis. ALTA Flow Cytometry Workshop, ALTA Europe, Garnwerd, The Netherlands, December 18-19, 2000. (félkért előadás).

3. Ismeretterjesztő közlemények

3.1. Szakcikk

- Nagy Szabolcs: Az utódok ivarának titka – Holstein Magazin, 1997. június, V. évf. 2. szám, 71. old.
- Nagy Szabolcs: A spermiumok morfológiai vizsgálatának szerepe a gyakorlatban – Holstein Magazin, 1998. december, VI. évf. 4. szám, 32. old.