

Animal welfare, etológia és tartástechnológia



Animal welfare, ethology and housing systems

Volume 9

Issue 3

Különszám/Special Issue

Gödöllő
2013



TEJ ALAPÚ HIGÍTÓK ALKALMAZÁSÁNAK LEHETŐSÉGE NYÚL SPERMA MÉLYHÜTÉSÉNÉL

*Balogh Laura¹, Kerekes Andrea², Debnár Viktória¹, Ray Krisztina¹,
Bodó Szilárd^{1,2}*

1. Szent István Egyetem, Állattenyésztés-tudományi Intézet
2103 Gödöllő, Páter Károly út 1.
2. Mezőgazdasági Biotechnológiai Kutatóközpont
2100 Gödöllő Szent-Györgyi A. u. 4
bodo.szilard@gmail.com

Összefoglalás

Napjainkra a mesterséges termékenyítés jelentős szerepet játszik a nyúltenyésztésben. A tenyésztők általában friss, vagy hűtött szaporítóanyaggal termékenyítenek, azonban néhány különleges esetben mélyhűtött spermát is felhasználnak. Veszélyeztetett fajták, vagy transzgénikus nyúlvonalak ex situ génmegőrzéséhez gamétabankokat hozhatunk létre. A spermabankok gyakorlati alkalmazásához megbízható mélyhűtési technológiát kell kialakítanunk. A hagyományos mélyhűtési protokollok tojássárgája alapú spermahígítók használatát javasolják. Habár ezen oldatok szűrésével és az antibiotikumok használatával a bakteriális fertőzés megelőzhető, a tojássárgája helyettesítésére kereskedelmi forgalomban kapható csíramentesített fogyasztási tejféléket (ESL, UHT tej) kívántunk kipróbálni egy aseptikus hígító létrehozásához. Kísérleteinkben a spermiumok túlélési- valamint a termékenyítőképes sejtek arányát a műszalmák felolvasztását követően vizsgáltuk.

Kulcsszavak: sperma mélyhűtés, nyúl, spermabank

Applicability of milk based diluters for cryopreservation of rabbit sperm

Abstract

Because of several advantages, the artificial insemination (AI) becomes an important method of the practice of rabbit breeding. Usually, the breeders use fresh or cooled semen for insemination, but in some special cases cryopreserved semen is applied. It is possible to create a gamete bank for ex situ genetic conservation of an endangered breed or transgenic rabbit lines using cryopreserved semen samples. For the practical application of sperm banking we have to develop a reliable cryopreservation technique. The advice of a conventional cryoprotocol is to use egg yolk based semen diluters. Although filtering and using antibiotics mainly prevents them from bacterial contaminations, we wanted to try using some routinely sterilized, commercial milk (ESL, UHT milk) for replacing egg yolk to create an aseptic diluter. We studied the rate of survival and fertility of sperm treated by different diluters after thawing of the cryopreserved staws.

Keywords: sperm cryopreservation, rabbit, sperm bank



Bevezetés

A mesterséges termékenyítés gyakorlata akárcsak néhány intenzív nyúltenyésztéssel foglalkozó európai országban, a magyarországi nyúltenyésztők körében is egyre jobban elterjedt (Mocé és mtsai, 2003). Az eljárás előnye, hogy a természetes pároztatás esetén felmerülő állategészségügyi kockázatok mérsékelhetők, a termékenyítéshez az apaállatok száma csökkenthető, s ennek révén a nagyobb szelekciós intenzitás mellett a genetikai előrehaladás is növelhető. A nyúltenyésztők napi gyakorlatában általánosan a 10-20-szorosára hígított friss spermával történő termékenyítést alkalmazzák (Szendrő, 2004), a mélyhűtésből származó felolvasztott spermával való termékenyítés azonban nem elterjedt eljárás.

Az *ex situ* génmegőrzés számára a termékenyítőképes szaporítóanyag hosszú távú eltárolása elengedhetetlen. A spermabankok kialakítása transzgenikus állatmodellek kialakítása esetén is nagy szerepet játszik, hiszen a genetikailag módosított vonalak *in situ* fenntartása mellett a hasznosítás időleges módja miatt a genetikai anyag gamétabankokban történő tárolása jelentősen csökkentheti a vonalfenntartás költségeit. Lényeges szempont, hogy a mélyhűtéssel történő tárolás során a termékenyítőanyag a termékenyítőképességét megőrizze. Ezt többek között a spermiumok mozgékonyásával, motilitásával jellemezhető élő állapot és a sejtek akroszóma membránjának épsége biztosítja. A spermaértékelés gyakorlata a sejtek életképességére irányul, amit viabilitási festéssel illetve motilitás vizsgálattal (szubjektív vagy számítógép segítette spermaértékelési módszer) határoznak meg. A mélyhűtési eljárás gyakorisága és fontossága ellenére a mélyhűtött nyúl spermiumok túlélési aránya ritkán 30% körüli, ami a sikeres termékenyülés feltétele. A spermabankok gyakorlati alkalmazásához olyan megbízható mélyhűtési technológiát kell kialakítanunk, ami eleget tesz ennek a minimális elvárásnak. A termékenyítőanyaggal szemben támasztott másik elvárás a felolvasztott spermaminta kórokozó mentessége. A hagyományos mélyhűtési protokollok tojássárgája alapú spermahígítók használatát javasolják (Mocé és mtsai, 2003). Habár ezen oldatok szűrésével és az antibiotikumok használatával a bakteriális fertőzés megelőzhető, kísérleteinkben a tojássárgája helyettesítésére kereskedelmi forgalomban kapható csíramentesített fogyasztási tejféléket (ESL, UHT tej) kívántunk kipróbálni aszeptikus hígító létrehozásához. A hígítók krioprotektív hatékonyságát felolvasztást követően hasonlítottuk össze, a spermaminták festéssel meghatározható, prediktív termékenyítőképességének (felolvasztást követő túlélés és akroszóma integritás) jellemezésével.

Anyag és módszer

Spermavétel

A Hycole bakokat *ad libitum* takarmányozással, napi 12 órás fényperiódust biztosítva állandó 20°C-on, 65-70% relatív páratartalmú állatházban tartottuk. A spermavétel nőstény állatra való ugratással, műhüvely alkalmazásával történt. Kísérleteinket három ismétlésben végeztük. A kinyert spermaminták motilitását szubjektív, fénymikroszkópos megfigyeléssel becsültük meg. A legalább 70%-ra becsült mozgó élősejt arányt elérő mintákat használtuk fel a kísérletekben, ezeket elegyítettük.

Mélyhűtés

A további hígítás számára egyenlő mennyiségeket alakítottunk ki a 9 kezelési csoport számára. A kontroll csoportban az előzetes mélyhűtési kísérleteinkben már alkalmazott hagyományos tojásalapú hígítót (M1: Weitze Tris, tojássárgája, DMSO; M2: Weitze Tris, tojássárgája, glicerin, DMSO) alkalmaztuk (Baranyai és mtsai, 2001, Kerekes és mtsai, 2012). UHT, ESL 1,5% és 2,8%



zsírtartalmú tejek felhasználásával a tojássárgáját térfogatarányosan helyettesítve készítettünk a mélyhűtési folyamat számára a krioprotektánst tartalmazó hígítókat. Az ESL és UHT tejmintákból fagyaszta szárítással tejport készítettünk, amikből rehidatálással szintén négyféle hígítót alakítottunk ki.

A mélyhűtés során a spermamintához eredeti térfogatának kétszeresének megfelelő mennyiségű M1 oldatot adtunk cseppenként. Az elsődleges hígítású elegyet 90 percre 4°C-ra helyeztük, majd a kiindulási térfogattal megegyező mennyiségű M2 hígítóval alakítottuk ki a minta végleges térfogatát. Ezt követően 0,25 ml-s műanyag műszalmákba töltöttük a mintákat és a csöveket polivinilalkohollal zártuk le. A műszalmákat 20 percen át 4°C-on vízszintesen tároltuk, majd folyékony nitrogén gőzébe helyeztük, a folyadék felszín felett 4 cm magasságban képzett tárolón 5 percig. A gyors átfagyási folyamat megkezdését követően az alkalmazott hígítónak megfelelő színkóddal jelölt műszalmákat a folyékony nitrogénbe merítettük és végül a folyékony nitrogénnel töltött mintatároló tartályba helyeztük.

Felolvasztás, fénymikroszkópos vizsgálat

A folyékony nitrogénből kivett műszalmákat 60 másodpercre 37,5°C-os vízfürdőbe helyeztük. A műszalmák tartalmát 1,5 ml-es Eppendorf csövekbe gyűjtöttük, amikből a festés számára mintákat vettünk.

A termékenyítőképes sejtek arányát a sejtek plazmamembránjának és akroszomájának integritása alapján határoztuk meg, Kovács-Foote féle élő/elhalt és akroszóma membrán-állapot meghatározására alkalmas fénymikroszkópos festést alkalmazva (Kovács és Foote, 1992). A kiértékelést binokuláris fénymikroszkóppal végeztük, 400x nagyítással. A spermiumfej posztakroszómális Chicago Sky Blue/neutrál vörös festékekkel való színeződése alapján állapítottuk meg a sejt élő állapotát, az akroszóma membrán épségére az akroszóma Giemsa/neutrál vörös színezéke utalt. Termékenyítőképes sejtek a kizárólag a bíborvörös akroszómális, világos posztakroszómális résszel, és sértetlen, rózsaszín farokkal rendelkező sejteket tekintettük. Tárgylemezenként 300 ivarsejt festődését figyeltük meg a Hamupipőke sejt számláló program segítségével, a sejteket termékenyítőképes és termékenyítésre alkalmatlan (elhalt, vagy élő, de akroszóma-, illetve farokmembrán sérült sejtek halmaza) kategóriákba sorolva (Nagy és mtsai, 1999).

Eredmények és értékelés

A kísérleti eredményeinket az 1. táblázatban foglaltuk össze. Az adatok statisztikai elemzéséhez Khi négyzet próbát használtunk, következtetéseinket erre alapozva fogalmaztuk meg.

1. táblázat: Túlélő, termékenyítő képes hímivarsejtek aránya a felolvasztást követően a különböző kezelési csoportokban

Hígítók ²	Túlélő termékenyítőképes sejtek %-os aránya ± SD ¹				
	ESL 1,5%	UHT 1,5%	ESL 2,8%	UHT 2,8%	Kontroll
Frissen készített ³	20,6 ± 2,2 ^a	14,5 ± 0,7 ^b	14,4 ± 3,2 ^b	13,7 ± 3,1 ^b	23,9 ± 2,4 ^a
Rehidatált ⁴	16,8 ± 3,1 ^b	16,0 ± 3,1 ^b	14,9 ± 2,5 ^b	14,9 ± 2,8 ^b	-

a,b: P>0,01

Table 1: Ratio of fertile, viable sperm cells in different treatment groups after thawing

¹Ratio of survived, fertile cells %± SD, ²Diluters, ³Freshly prepared, ⁴Rehydrated



Az elemzés alapján csak egyetlen kísérleti kezelési csoport túlélési eredménye nem mutatott szignifikáns eltérést a kontroll csoport eredményétől (23,9%). A frissen feldolgozott ESL 1,5%-os zsírtartalmú tej alapú hígítóval kezelt spermiumok 20,6 %-a őrizte meg a termékenyítőképességét a Kovács-Foote féle festéssel való értékelés alapján. A többi kezelési csoport eredménye gyengébb túlélésre utalt és az eltérés szignifikánsan különbözött a kontroll csoport eredményétől.

Következtetések és javaslatok

Vizsgálatainkban különböző tej alapú hígítók felolvasztás utáni túlélésre gyakorolt hatását vizsgáltuk, a hagyományos tojássárgáját tartalmazó hígítóval összehasonlítva. Megállapítottuk, hogy a kezelése során az 1,5 %, csökkentett zsírtartalmú ESL tej használatával elérhető a hagyományos hígító alkalmazásakor jellemző túlélési eredmény. A liofilizált, majd rehidratált mintával azonban nem sikerült ezt a hatékonyságot reprodukálni. További kísérletekben kívánjuk tisztázni, hogy az UHT kezelés, illetve a fagyasztva szárítás során milyen tényezők hatása miatt csökken a tej adalék krioprotektív hatása. A továbbiakban egyedi bakoktól származó, elkülönített spermaminták mélyhűtését is tervezzük, mely során alacsonyabb zsírtartalmú (0,5% zsírtartalom) tejjel kívánjuk helyettesíteni a tojás sárgáját az M1 és M2 hígítókból.

Köszönetnyilvánítás

A szerzők köszönetüket fejezik ki a Mezőgazdasági Biotechnológiai Kutatóintézet Állatbiotechnológiai Intézetében dolgozó munkatársaknak, hogy lehetővé tették és segítették a kísérletek lebonyolítását. A munkánkhoz a „Kutató Kari Kiválósági Támogatás– Research Centre of Excellence- 17586-4/2013/TUDPOL” és a „Alternatív biotechnológiai módszerek bevezetése a magyar in vitro baromfi- és nyúl génbank fejlesztése céljából. KTIA_AIK_12-1-2013-0002” támogatások nyújtottak segítséget.

Irodalomjegyzék

- Baranyai B., Somfai T., Virág Gy., Laczkó L., Ri Hak Chol, Polgár Zs., Gócza E.* (2001): Nyúlsperma hosszú távú tárolási lehetőségének vizsgálata. Proc. 13. Nyúltenyésztési Tudományos Nap, Kaposvár, 47-53.
- Kerekes A., Kriczky N., Kása E., Bősze Zs., Bodó Sz.* (2012): Nyúlsperma mélyhűtési protokollok vizsgálata 24. Nyúltenyésztési Tudományos Nap, Kaposvár, 51-4.
- Kovács A., Foote R.H.* (1992): Viability and acrosome staining of bull, boar and rabbit spermatozoa. *Biot Histoc*, 67. 119-124.
- Mocé E., Vicente J.S., Lavara R.* (2003): Effect of freezing–thawing protocols on the performance of semen from three rabbit lines after artificial insemination. *Theriogenology*, 60. 1. 115-123.
- Nagy Sz., Házás G. Bali Papp Á., Iváncsics J., Szász F., Szász F. Jr. , Kovács A., Foote R.H.* (1999): Evaluation of sperm tail membrane integrity by light microscopy – *Theriogenology* 52:1153-1159.
- Szendró Zs.* (2004): A nyulak mesterséges termékenyítése. *Kistermelők Lapja*, 1. 16-17.