

**DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS**

**NAGY SZABOLCS TAMÁS**

**MOSONMAGYARÓVÁR**

**2001**

NYUGAT-MAGYARORSZÁGI EGYETEM  
MEZŐGAZDASÁGTUDOMÁNYI KAR, MOSONMAGYARÓVÁR  
Állattenyésztési Intézet

Programvezető és témavezető  
DR. DR. h.c. IVÁNCICS JÁNOS  
az MTA doktora

**BIKASPERMIUMOK CITOLÓGIAI VIZSGÁLATAI**

Készítette:  
**NAGY SZABOLCS TAMÁS**

MOSONMAGYARÓVÁR

2001

## BIKASPERMIUMOK CITOLÓGIAI VIZSGÁLATAI

Értekezés doktori (PhD) fokozat elnyerése érdekében

Készült a Nyugat-Magyarországi Egyetem „Az állati termék előállítás biológiai, technológiai és ökonómiai kérdései” program „Szarvasmarha termékek előállítása és feldolgozása” alprogramja keretében.

Témavezető: Dr. Iváncsics János

Elfogadásra javaslom (igen/nem)

(aláírás)

A jelölt a doktori szigorlaton .....%-ot ért el.

Mosonmagyaróvár

.....

a Szigorlati Bizottság elnöke

Az értekezést bírálóként elfogadásra javaslom (igen/nem)

Első bíráló (Dr. ....) igen/nem

(aláírás)

Második bíráló (Dr. ....) igen/nem

(aláírás)

(Esetleg harmadik bíráló (Dr. ....) igen/nem

(aláírás)

A jelölt az értekezés nyilvános vitáján .....%-ot ért el.

Mosonmagyaróvár,

a Bírálóbizottság elnöke

A doktori (PhD) oklevél minősítése .....

az EDT elnöke

# TARTALOMJEGYZÉK

<b>1. FEJEZET: BEVEZETÉS, IRODALMI ÁTTEKINTÉS</b>	<b>5.</b>
1.1. KLASSZIKUS ÉS ÚJ SPERMAMINŐSÉG-VIZSGÁLATI MÓDSZEREK	6.
1.1.1. <i>Motilitásvizsgálatok</i>	6.
1.1.2. <i>Morfológia</i>	9.
1.1.3. <i>Sejtanyagcsere-vizsgálatok</i>	10.
1.1.4. <i>Membránintegritás-vizsgálatok</i>	12.
1.1.4.1. Fénymikroszkóppal értékelhető festési eljárások	12.
1.1.4.2. Fluoreszcens festési eljárások	16.
1.1.4.3. Áramlási sejtanalízis (flow citometria)	18.
1.1.4.4. Funkcionális membránintegritás értékelése hipoozmotikus teszt (HOST) segítségével	20.
1.1.5. <i>Kapcsolatba hozhatók-e az egyes teszteredmények a fertilitással?</i>	20.
1.2. JELEN DOLGOZAT CÉLKITŪZÉSEI	21.
1.3. IRODALOM	22.
<b>2. FEJEZET: A SPERMIUMFAROK-MEMBRÁN ÉRTÉKELÉSE FÉNYMIKROSKÓP SEGÍTSÉGÉVEL</b>	<b>33.</b>
2.1. BEVEZETÉS	33.
2.2. ANYAG ÉS MÓDSZER	34.
2.3. EREDMÉNYEK	36.
2.4. KÖVETKEZTETÉSEK	39.
2.5. IRODALOM	40.
<b>3. FEJEZET: SPERMIUMOK MOTILITÁSÁNAK ÉS MEMBRÁNINTEGRITÁSÁNAK ÖSSZEHASONLÍTÓ VIZSGÁLATAI</b>	<b>43.</b>
3.1. BEVEZETÉS	43.
3.2. ANYAG ÉS MÓDSZER	44.
3.2.1. <i>Spermaminták</i>	44.
3.2.2. <i>Membránintegritás-vizsgálat</i>	45.
3.2.3. <i>Számítógépes motilitásvizsgálat</i>	45.
3.2.4. <i>Statisztikai elemzés</i>	46.
3.3. EREDMÉNYEK	46.
3.4. KÖVETKEZTETÉSEK	48.
3.5. IRODALOM	51.

<b>4. FEJEZET: SPERMIUMOK MEMBRÁNINTEGRITÁS-VIZSGÁLATAI: FÉNYMIKROSKÓPOS ÉS FLOW CITOMÉTERES ÉRTÉKELÉSI MÓDSZEREK ÖSSZEHASONLÍTÁSA RUTIN KÖRÜLMÉNYEK KÖZÖTT</b>	<b>54.</b>
4.1. BEVEZETÉS	54.
4.2. ANYAG ÉS MÓDSZER	55.
4.2.1. <i>Vegyszerek</i>	55.
4.2.2. <i>Spermaminták</i>	56.
4.2.3. <i>Fénymikroszkópos értékelés</i>	56.
4.2.4. <i>Flow citometria</i>	57.
4.2.5. <i>Statisztikai értékelés</i>	60.
4.3. EREDMÉNYEK	60.
4.3.1. <i>Ismételhetőség-vizsgálatok</i>	60.
4.3.2. <i>Módszer-egyetértési analízis</i>	64.
4.4. KÖVETKEZTETÉSEK	64.
4.5. IRODALOM	66.
<b>5. FEJEZET: BIKASPERMIUMOK MEMBRÁN-ÉS AKROSZÓMAINTEGRITÁSÁNAK FLOW CITOMÉTERES ÉRTÉKELÉSE ÚJ FESTÉKKOMBINÁCIÓ SEGÍTSÉGÉVEL</b>	<b>69.</b>
5.1. BEVEZETÉS	69.
5.2. ANYAG ÉS MÓDSZER	72.
5.2.1. <i>Spermaminták</i>	72.
5.2.2. <i>FITC-PNA/PI festés</i>	72.
5.2.3. <i>SPP festés</i>	73.
5.2.4. <i>Flow citométer</i>	74.
5.2.5. <i>Kísérlet menete</i>	81.
5.2.6. <i>Statisztikai elemzés</i>	81.
5.3. EREDMÉNYEK	82.
5.3.1. <i>Az 1. kísérlet eredményei</i>	83.
5.3.2. <i>A 2. kísérlet eredményei</i>	83.
5.4. KÖVETKEZTETÉSEK	88.
5.5. IRODALOM	90.
<b>6. FEJEZET: KÖVETKEZTETÉSEK, JAVASLATOK</b>	<b>93.</b>
<b>ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK</b>	<b>101.</b>
<b>ÖSSZEFOGLALÁS</b>	<b>102.</b>
<b>SUMMARY</b>	<b>104.</b>
<b>KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS</b>	<b>106.</b>

# 1. FEJEZET

## BEVEZETÉS, IRODALMI ÁTTEKINTÉS

A mesterséges termékenyítés sikerének alapfeltétele a jó minőségű termékenyítő anyag használata. Az ondósejteknek küldetésük, a genetikai anyag célba juttatása érdekében legalább a következő tulajdonságokkal kell bírniuk: megfelelő anyagcsere az energiatermelés érdekében, progresszív motilitás, megfelelő membránszerkezet, az akroszóma enzimeit, normális morfológia (Amann és Graham, 1993). Ezen túl, a termékenyítő ondósejt genetikai anyaga is befolyásolhatja a fertilizációt, illetve az embrionális fejlődést. A genomnak tartalmaznia kell a fejlődéshez szükséges géneket, továbbá mentesnek kell lennie a letális terheltségektől, vagy a fejlődést gátló extra genetikai anyagtól (Amann és Hammerstedt, 1993).

Az ideális spermaminőség-vizsgálati teszt jellemzői Hammerstedt (1996) szerint a következők:

1. egyszerűség, azaz a felhasználói igényeknek (például egy mesterséges termékenyítő állomás laboratóriuma) megfelelő körülmények között könnyen alkalmazható módszer,
2. elfogadhatóság, azaz a felhasználó lássa értelmét az adott teszt használatának,
3. a teszt használatából eredő előnyök igazolják a használat ráfordításait,
4. pontosság, azaz a kapott eredmények lehetőleg minél jobban egyezzenek a vizsgált tulajdonság standard értékeivel,

5. precizitás, azaz az ismételt mérések egyezzenek egymással,
6. szenzitivitás, azaz a vizsgált tulajdonság szempontjából pozitív egyedek felismerése,
7. specifititás, azaz a vizsgált tulajdonság szempontjából negatív egyedek felismerése.

A rutin spermavizsgálatok során leggyakrabban használt tesztek az alábbiakról adnak információt (Foote, 1975):

- makroszkópos vizsgálatok (az ejakulátum térfogata, színe, konzisztenciája, pH-ja stb.)
- spermium-koncentráció
- az előrehaladó mozgást végző sejtek aránya
- festetlen sejtek aránya, valamely vitális festékkel értékelve
- normál morfológiájú sejtek aránya, különös tekintettel az akroszómára
- mélyhűtött/felolvasztott sperma vizsgálatokor különböző stressz-tesztek.

## 1.1. KLASSZIKUS ÉS ÚJ SPERMAMINŐSÉG-VIZSGÁLATI MÓDSZEREK

### *1.1.1. Motilitásvizsgálatok*

A spermiumok mozgásának hagyományos értékelési módszere a vizuális bírálat mikroszkóp (általában fázis-kontraszt) segítségével (Garner, 1997). A módszer ugyan gyors, egyszerű és viszonylag olcsó (nem igényel drága berendezéseket), azonban nagyon szubjektív, így gyakorlatilag inkább becslésnek, mintsem mérésnek tekinthető, hiszen gyakran

elfogadhatatlanul nagy eltérések tapasztalhatók bírálók, illetve ugyanazon személy ismételt mérései között (Jequier és Ukombe, 1983). A vizsgálatok pontosságának növelése érdekében Brady és Gidlow (1939) az következő módszert dolgozta ki: a mérőkamra 25 nagy négyzetében számolták a mozgó és mozdulatlan sejteket, majd a mérőkamrát fagyasztószekrénybe helyezve elölték a spermiumokat és újraszámolták a mintákat. Az alábbi képletek segítségével határozták meg a motilis sejtek %-os arányát:

nem mozgó spermiumok száma elölés előtt x 100 / összes sejtszám elölés  
után = nem mozgó spermiumok %-os aránya.

A kapott értéket 100-ból kivonva kapták meg a motilis sejtek arányát.

A módszer azonban nem terjedt el a gyakorlatban, hiszen meglehetősen idő- és munkaigényes.

A motilitásvizsgálatok objektívebbé tételének egyik korai módszere az úgynevezett hosszú expozíciós idejű sötétlátóterű fényképezés volt (Elliott és mtsai, 1973, idézi Garner, 1997). Az 1-2 másodperces expozíciós idővel felvett felvételeken a nonmotilis sejtek tisztán kivehetők voltak, míg a motilis sejtek a mozgás sebességétől függő hosszúságú sávként tűntek fel.

A számítástechnika fejlődésével megjelentek az úgynevezett számítógépes spermavizsgáló berendezések (Computer-Assisted Semen Analyzer, CASA, Amann, 1988, Holt, 1996). A berendezések alkalmasak a mozgó sejtek arányán túl az egyes sejtek mozgási paramétereinek objektív értékelésére is (Amann és Graham, 1996). A CASA-készülékek használhatóságának azonban jelenleg több kérdéses pontja is van (ezek nyilvánvalóan további kutatások irányát is adhatják). Problémát jelent



például a nem mozgó ondósejtek és a hígítóban lévő részecskék megkülönböztetése – a megoldás felé ígéretes lépés DNS-specifikus fluoreszcens festékek alkalmazása a spermiumok és az egyéb alakos elemek megkülönböztetésére (Farrell és mtsai, 1996).

Mivel mind a friss, mind a mélyhűtött/felolvasztott bikaspermát hígítani szükséges a CASA-értékeléshez, további kérdéses pont a használt hígító közeg: Robertson és mtsai (1988) kimutatták, hogy a fiziológiás sóoldat megváltoztatja a motilitási paramétereket, Hirai és mtsai (1997) a különböző konvencionális spermahígítók eltérő viszkozitásának a motilitásra gyakorolt hatását írták le. Mortimer és mtsai (1988) szerint a legjobb megoldás (legalábbis humán minták elemzése esetében) kevert ondóplazma használata – ez azonban mesterséges termékenyítő állomásokon nyilvánvalóan nem megoldható. Krause és Viethen (1999) a fő problémát a CASA rendszerek szoftver-beállításában látják: standard minták, értékek hiányában nem megoldott a programok algoritmusainak ellenőrzése, kalibrálása, továbbá – érthető módon – a programfejlesztők, gyártók üzleti titokként kezelik ezeket az algoritmusokat, amelyek így nem ellenőrizhetők matematikai, statisztikai szempontból sem.

Összefoglalva, az automatizált motilitásvizsgáló berendezések inkább a kutatólaboratóriumokban találják meg helyüket, és különösen hasznosak az olyan speciális területeken, mint például a szaporodásbiológiai toxikológia (Vetter és mtsai, 1998).

### *1.1.2. Morfológia*

Rendellenes alakú ondósejtek minden ejakulátumban megtalálhatók, 5-10% patológiás spermium megjelenése a spermában még normálisnak tekinthető (Nagy, 1965). Az abnormális alakú ondósejtek és a termékenyítőképesség közötti kapcsolatot már a múlt század elején felismerték: Williams és Savage (1927) szerint a jó fertilitású bikák spermiumfejeinek méretei egyformák, az ejakulátumaik nem tartalmaznak 17%-nál több defektes ondósejtet, és a rendellenes alakú spermiumok elfogadható aránya nagyban függ a rendellenességek jellegétől. Barth és Oko (1989) "Abnormal morphology of bovine spermatozoa" című összefoglaló művükben részletesen ismertetik az egyes spermiumdefektusok ultrastrukturális hátterét, kialakulásuk főbb okait, hatásukat a termékenyítőképességre.

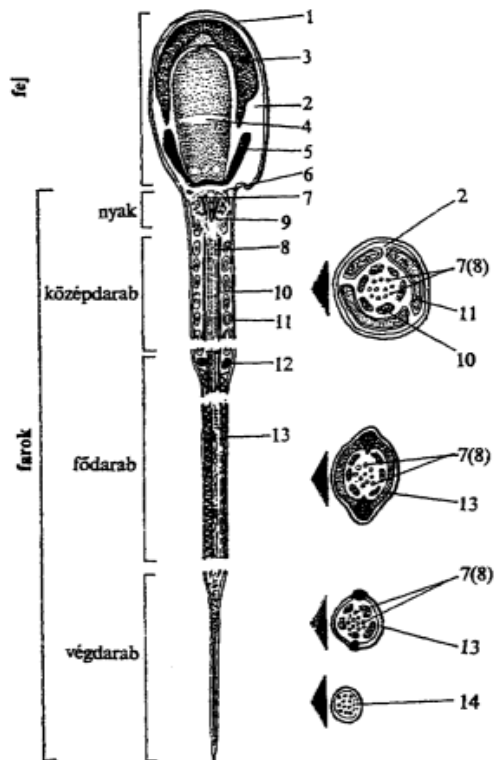
A morfológiai vizsgálatok fő eszköze a fénymikroszkóp: számos olyan festési eljárás ismert, amely segítségével az ondósejtek alakja értékelhető (Sarlós és Wekerle, 1990), míg egyes rendellenességek, mint például az úgynevezett kráter defektus (Foote, 1999) értékeléséhez – a meglehetősen költséges - differenciál-interferencia-kontraszt mikroszkóp (DIC) szükséges. Ez utóbbi segítségével – folyékony preparátumokon, fedőlemez alatt - az akroszóma állapota is értékelhető (Saacke és Marshall, 1968). A módszer kétségkívül gyors és egyszerű, hiszen nincs szükség festékekre, azonban a sejtek passzívan mozoghatnak a fedőlemez alatt, lehetetlenné téve a későbbi azonosítást, továbbá a sejtek gyakran agglutinálódnak (saját észrevétel, 2000).

Az alaktani vizsgálatok új, objektív eszköze a számítógépes morfológia-értékelő berendezés (Automatized Sperm Morphology Analyzer, ASMA, Boersma és Braun, 1999). Az ASMA-készülékek festett keneteken

automatikusan rögzítik az egyes spermiumok fejének hosszúsági és szélességi méreteit, majd az adatokból kiszámított indexértékek alapján osztályozzák a sejteket. Bár a módszer ígéretes, a fő problémát az jelenti, hogy az enyhe rendellenességeket nem képes kimutatni, továbbá közismert, hogy egyes bikáknak jellemzően eltérhet a spermium-fejformája, valamint az úgynevezett "körte" defektus esetén a fejméretetek (hosszúság, szélesség) normális értéket mutatnak.

### *1.1.3. Sejttanyagcsere-vizsgálatok*

Az olyan metabolikus festékekkel végzett tesztek, mint a rezazurin, vagy a metilénkék, szintén alkalmasak a spermaminták termékenyítő-képességének vizsgálatára (Carter és mtsai, 1998). A spermamintákhoz kémcsőben adott festék redukálódásának, elszíntelenedésének ideje és a spermiumkoncentráció, illetve a motilis spermiumok aránya között több faj esetében is kapcsolatot találtak (bika: Dart és mtsai, 1994, sertés: Mesta és mtsai, 1995, mén: Carter és mtsai, 1998, kos: Martin és mtsai, 1999). Ezen tesztek fő problémája azonban az, hogy nem sejtszinten adnak információt, csupán egy átlagértéket kapunk a mintáról. Így például egy 20%-os eredmény egyaránt jelentheti azt, hogy a mintában található ondósejtek 20 %-a 100%-os választ adott, illetve azt, hogy a sejtek 100%-a adott 20%-os választ. Értelemszerűen, az első eset a szerencsésebb (Amann és Graham, 1996). Érdelesebb tehát vizsgálatainkat sejtszinten végezni.



**1. ábra.** Az emlősspermiumok szerkezete (Becze, 1983)

1. sejthártya, 2. citoplazma, 3. akroszóma, 4. ekvatoriális zóna, 5. posztakroszomális rész, 6. bazális lemezek, 7. centriólumok és a belőlük eredő 2+9 rost, 8. rostkötegek, 9. nyaklemezek, 10. külső rostos hüvely, 11. mitokondriumok, 12. annulusz, 13. spirális hüvely, 14. kifejezett struktúra nélküli rész.

#### *1.1.4. Membránintegritás-vizsgálatok*

Az ondósejtek plazmamembránja nem egységes, az egyes spermiumszubdoméneket borító membránok szerkezete és élettani funkciója eltérő (Amann és Graham, 1996). A spermiumokra két – egyértelmű – makrodomén, a fej és a fark jellemző. Ezek további szubdoménekre oszthatók: a fejen találjuk az akroszómális régiót, az ekvatoriális zónát, illetve a posztakroszómális régiót, a fark pedig középdarabra és fődarabra osztható (1. ábra). Az egyes alrégiók membránjait olyan strukturális elemek választják el, mint a nyaki gyűrű a fej és a középdarab, illetve az annulus, vagy Jensen-gyűrű a közép- és fődarab között (Ladha és mtsai, 1997).

A strukturális membránintegritás vizsgálatára számos festési módszer ismert, a funkcionális integritás pedig az úgynevezett hipoozmotikus teszt (Hypoosmotic Swelling Test, HOST) segítségével értékelhető.

##### *1.1.4.1. Fénymikroszkóppal értékelhető festési eljárások*

Lasley és mtsai (1942) eozin és opálkék festékeket használtak az élő és elhalt spermiumok megkülönböztetésére: az eozin csak a sérült plazmamembránon hatol át, így az elhalt sejtek narancssárgára festődtek, az élők pedig festetlenek maradtak. Az opálkék kontrasztfestékként tette lehetővé a festetlen sejtek észlelését. Számos további festékkombináció ismert még, például: revector soluble blue-neutrálvörös (Crooke és Mandl, 1947), eozin-anilinkék (Shaffer és Almquist, 1948), eozin-nigrozin (Blom, 1950, Swanson és Bearden, 1951), brómfenolkék-nigrozin (Rauhaus,

1990). A vizsgálati elv azonos: a vitális festék csak az elhalt sejteket jelöli, a kontrasztfesték pedig a festetlen sejteket teszi láthatóvá. Meg kell említeni, hogy a festetlen sejtek "élő" volta nem tekinthető biztosnak, és helyesebb lenne csupán "membrán-impermeábilis" sejtekről beszélni (Dumont, 1998), hiszen a fent említett festékekkel csupán a spermiumfej plazmamembránjának épségéről kapunk információt.

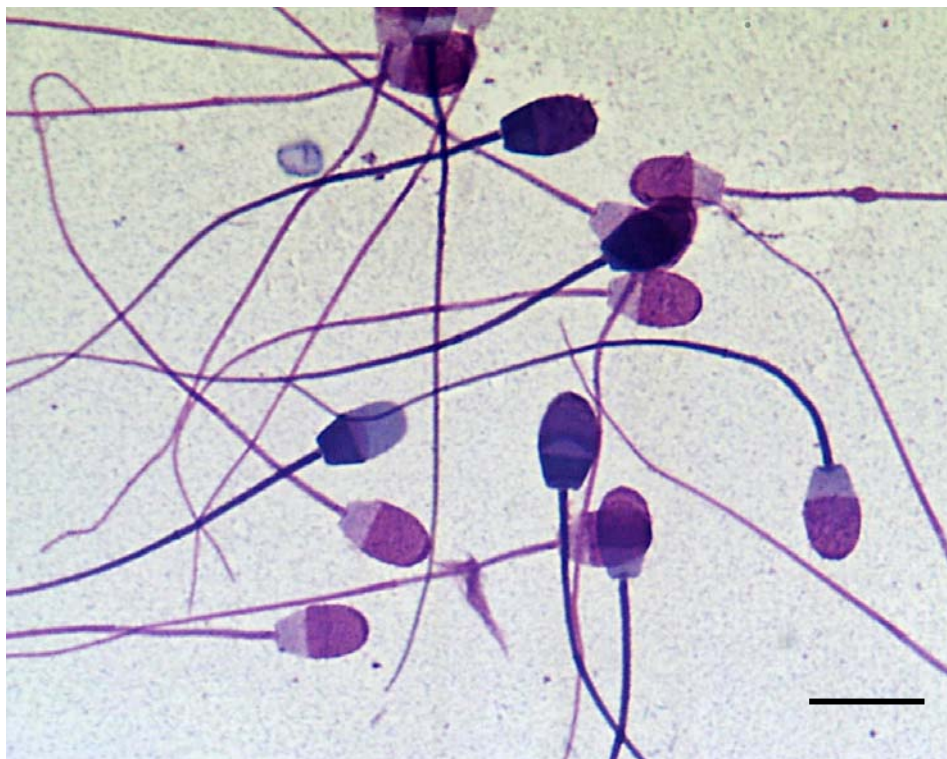
Az akroszóma épségének vizsgálata szintén fontos a sperma minőségének megállapítására, különösen mélyhűtött/felolvasztott minták esetében, mivel a fagyasztás és felolvasztás folyamata a kapacitációhoz hasonló élettani változásokat idéz elő (Watson, 1995). A már korábban említett differenciál-interferencia-kontraszt mikroszkópos értékelés olcsóbb, fénymikroszkópos alternatívájaként több festési eljárás ismert (eozin B/Fast Green FCF: Wells és Awa, 1970, Giemsa: Hancock, 1952, idézi Watson, 1975, Procion Printing Green B: Chacarov és Mollova, 1976, Spermac: Oetlé, 1986, Coomassie kék: Larson és Miller, 1999). A Spermac festékkombináció összetétele ismeretlen, mivel a gyártó cég (Stain Enterprises, Onderstepoort, Dél-Afrikai Köztársaság) védett festékkészlet formájában forgalmazza. Bár számos publikáció tárgyalja a Spermac festék egyszerűségét, gyorsaságát, jelen dolgozat szerzője nem osztja ezt a lelkesedést: a rövid, néhány perces festési idő előnyös lehet egy humán andrológiai klinikán egy-egy minta vizsgálatakor, azonban egy mesterséges termékenyítő állomás rutin termelési napján gyakran húsznál is több ejakulátum vizsgálatára kerül sor, és tekintve, hogy a keneteket száradás után öt percen belül festeni kell, a festés nehezen illeszthető a munkarendbe. Ezen felül, Barth és Oko (1989) szerint a Spermac festés nem alkalmas hígított, mélyhűtött/felolvasztott minták értékelésére, és a

citoplazmacseppek vizsgálatára sem használható (Schäfer és Holzmann, 2000). Érdekes módon a festés használhatóságáról szóló tanulmányok többsége nem közöl fotót.

Előnyös, ha az akroszóma értékelésekor egyidejűleg az élő/elhalt állapotot is értékeljük, így különbséget tudunk tenni a tényleges és "fals" akroszómareakció között. ("Fals" akroszómareakciónak tekintjük a sejthalál során bekövetkező degeneratív membránváltozást.)

Aalseth és Saacke (1986) a már említett eozin-fast zöld festést kombinálták a DIC mikroszkópos akroszómaértékeléssel. Talbot és Chacon (1981) humán sperma vizsgálatára tripánkéket használt vitális festékként, az akroszómát pedig bengálvörös és Bismarck barna kombinációjával festették. Ezt az úgynevezett "triple stain" módszert sikerrel alkalmazták számos állatfaj spermájának vizsgálatára (egér: Dudenhausen és Talbot, 1982, kecske: Kusunoki és mtsai, 1984, szarvasmarha: Didion és Graves, 1986, sertés: Kusunoki és mtsai, 1987, ló: Varner és mtsai, 1987). A festés azonban túl lassú és bonyolult a rutin felhasználás szempontjából (Kovács és Foote, 1992, Tamuli és Watson, 1994).

Kovács és Foote (1992) egy jóval egyszerűbb festési módszert dolgozott ki. Tripánkék, neutrálvörös és Giemsa kombinációjával a plazmamembrán, illetve az akroszóma állapotától függően tíz kategóriát állapítottak meg, ebből rutin körülmények között hat kategóriát érdemes vizsgálni (2. ábra, Kovács, személyes közlés, 1997).



**2. ábra.** Kosspermiumok élő/elhalt és akroszómafestése Kovács és Foote (1992) módszere szerint. A vízszintes vonal 10  $\mu\text{m}$ -t jelöl.

Az élő és elhalt sejtek megkülönböztetéséhez a fej hátulsó, az akroszóma épségéről annak elülső része ad információt:

- Élő: világos (fehér-halvány rózsaszín)
- Elhalt: sötét (fekete- ibolyaszín – szürke)
- Akroszóma:
  - Ép: bíborvörös
  - Fellazult: sötét levendula
  - Sérült: világos levendula
  - Nincs: világos apikális rész

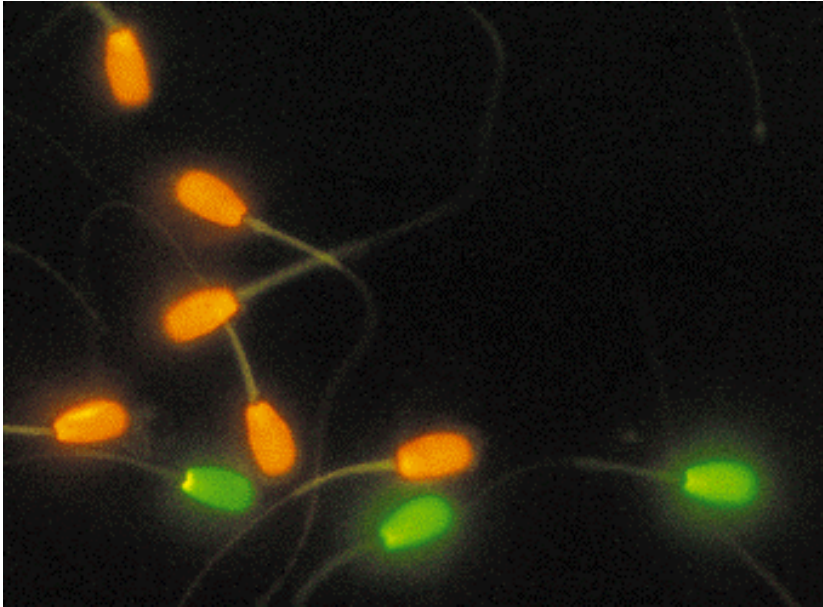


#### 1.1.4.2. Fluoreszcens festési eljárások

A fénymikroszkópos vizsgálatok előnye, hogy nem igényelnek drága műszereket, azonban egyes festékek kötődését zavarhatják a spermahígítóban található olyan anyagok, mint például a glicerín vagy a tojássárgája (Mixner és Saroff, 1950, idézi Garner, 1997). Fluoreszcens festékek alkalmazásával ez elkerülhető, és ezekkel a festékekkel olyan átlátszatlan közegben is értékelhetőek a spermiumok, mint például a főlözött tejes hígító (VanDemark és mtsai, 1959, idézi Garner és mtsai, 1986).

Az élő és elhalt sejtek vizsgálatára Mátyus és mtsai (1984) fluoresceindiacetát (FDA) és propidium-jodid (PI) kombinációját alkalmazták, Garner és mtsai (1986) karboxi-fluoresceint (CFDA) használtak propidium-jodid mellett. A CFDA molekulák nem fluoreszkálnak és képesek áthatolni az ép sejtmembránon. A sejtben belüli észteráz enzimek azonban lehasítják a diacetát-részt, és a szabad karboxi-fluorescein molekulák erős zöld fluoreszcenciát mutatnak, továbbá nem képesek kijutni a sejtmembránon, így jelölik az ép plazmamembránnal bíró ondósejteket. A propidium-jodid, nukleinsav-specifikus, vörösen fluoreszkáló festék, kontrasztfestékként használható, mivel csak a sérült plazmamembránon képes áthatolni. Ezek a festési módszerek azonban rendkívül szigorúan ellenőrzött laboratóriumi körülmények között használhatók csak megfelelően, mivel az enzimaktivitást számos külső tényező befolyásolhatja. Garner és mtsai (1994) ezért egy egyszerűbben használható kombinációt dolgoztak ki: a SYBR 14 nevű DNS-specifikus fluoreszcens festék képes áthatolni a sejtmembránon, és a DNS-hez

kötődve erős zöld fluoreszcenciát mutat. Kontrasztfestékként ők is propidium-jodidot használtak (3. ábra). A festési módszert számos állatfajon és emberen is sikerrel alkalmazták (Garner és Johnson, 1995, Donoghue és mtsai, 1995, Collins és Donoghue, 1999).



**3. ábra.** SYBR 14/PI kombinációval festett spermiumok. Az élő, ép plazmamembránnal bíró ondósejtek zölden fluoreszkálnak (SYBR 14), az elhalt sejtek vörösre festődnek (PI). Fotó: DL Garner. Forrás: Molecular Probes ([www.probes.com](http://www.probes.com))

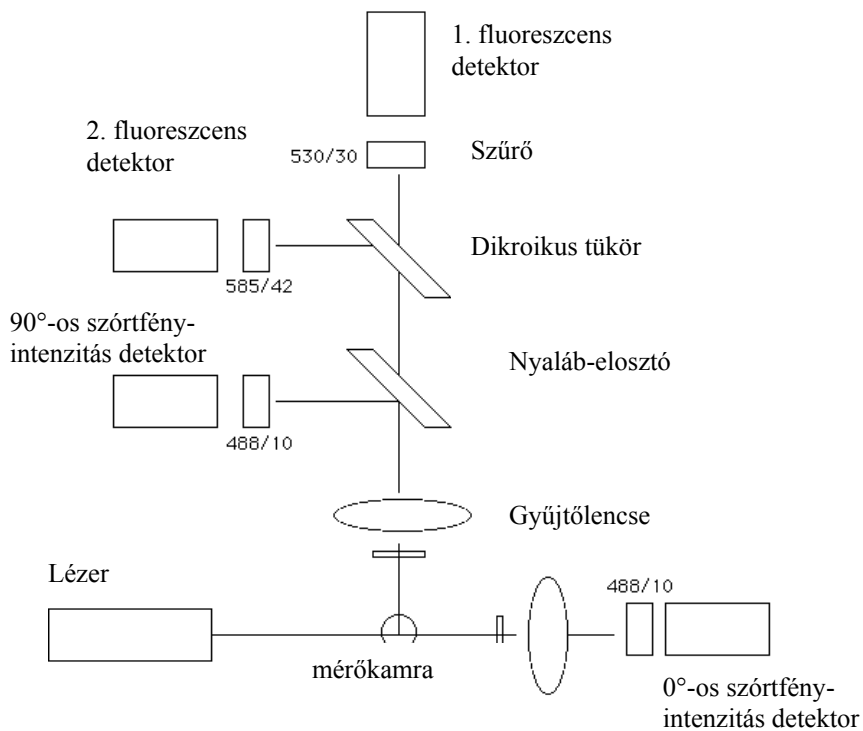
Fluoreszcens festékek segítségével a spermiumok sejtstruktúrájában is értékelhetők (Baccetti és mtsai, 1992). Az akroszóma épségének vizsgálatára leggyakrabban különböző, fluoreszcens próbákkal konjugált

lektinek (*Pisum sativum*, *Arachis hypogea*, *Triticum vulgare*, stb) használatosak (Cross és Meizel, 1989, Miyazaki és mtsai, 1990, Valcárcel és mtsai, 1997). Klór-tetraciklin (CTC) segítségével a kapacitáció stádiuma értékelhető (Gillan és mtsai, 1997). A működő mitokondriumok a spermiumfarok középrésében szintén értékelhetők: Evenson és mtsai (1982) rodamin 123, Sutovsky és mtsai (1996) Mitotracker Green FM, Garner és Thomas (1999) pedig JC-1 (5,5',6,6'-tetrakloro-1,1',3,3'-tetraetil-benzimidazolyl-karbocianin-jodid) segítségével vizsgálták a mitokondriumok aktivitását.

#### 1.1.4.3. Áramlási sejtanalízis (flow citometria)

A fluoreszcens spermafestési módszerek nagy előnye, hogy azok flow citométer segítségével is értékelhetők. A flow citometria, vagy áramlási sejtanalízis rövid idő alatt nagyszámú sejt (10 000 sejt mintánként, másodpercenként akár 1000-2000 spermium) objektív értékelését teszi lehetővé (Parks, 1992). A 4. ábrán egy flow citométer sematikus rajza látható. A spermiumok vivőfolyadékban egyesével jutnak a mérőkamrába, ahol lézersugáron haladnak keresztül. A spermiumok által visszavert fény a sejtek méretéről és belső összetettségéről ad információt, a lézer pedig a spermiumokhoz kötődő fluoreszcens festékeket is gerjeszti, így a berendezések multiparaméteres analízisre is alkalmasak (Shapiro, 1983). Citométer segítségével értékelhető az élő és elhalt spermiumok aránya (Mátyus és mtsai, 1984, Szöllősi és mtsai, 1986b, Garner és mtsai, 1986, 1994, Pajor és Pásztory, 1991, stb), az akroszóma integritása (Miyazaki és mtsai, 1990, Tao és mtsai, 1993, Thomas és mtsai, 1997, Pena és mtsai,

1999a, 1999b, Szász és mtsai, 2000, stb), a mitokondriumok épsége (Evenson és mtsai, 1982, Auger és mtsai, 1989, Garner és mtsai, 1997, Papaioannou és mtsai, 1997, Gravance és mtsai, 2000, stb), illetve a spermiumkoncentráció (Evenson és mtsai, 1993, Szöllősi és mtsai, 1986a). Graham és mtsai (1990) egyidejűleg értékelték az élő/elhalt sejtek arányát, az akroszómaintegritást és a mitokondriális aktivitást. Az újabb, többlézeres citométerek a morfológiai paramétereken túl akár négy-hat fluoreszcens festék egyidejű használatát teszik lehetővé.



**4. ábra.** Áramlási sejtanalizátor (flow citométer) sematikus rajza

#### 1.1.4.4. A funkcionális membránintegritás értékelése hipoozmotikus teszt (HOST) segítségével

Ahogy azt Kölliker 1856-ban megállapította (idézi Drevius, 1963), a spermiumok farka feltekeredik, ha a spermát vízzel hígítjuk. A jelenség magyarázata az, hogy az ozmotikus kiegyenlítődés érdekében víz jut be a sejtekbe. Mivel a spermiumok feje kompakt, a vízfelvétel okozta duzzadás inkább a farki rész elhajlásán, feltekeredésén látható.

Jeyendran és mtsai (1984) egy egyszerű mikroszkópos tesztet dolgoztak ki a membránintegritás értékelésére abból az észlelésből kiindulva, hogy az elhalt, sérült membránnal bíró ondósejtek hipoozmotikus közegben nem mutatják a fent említett farkreakciót. A hipoozmotikus tesztet azóta számos háziállatfajon sikerrel alkalmazták (szarvasmarha: Correa és Zavos, 1994, sertés: Vazquez és mtsai, 1997, ló: Neild és mtsai, 1999). A módszer hátránya azonban, hogy a spermiummorfológia egyidejű értékelését lehetetlenné teszi.

#### *1.1.5. Kapcsolatba hozhatók-e az egyes teszteredmények a fertilitással?*

A spermatólógiai kutatások "Szent Grálja" (Hammerstedt, 1996) egy olyan teszt kidolgozása, amely segítségével a fertilitás biztosan előrejelezhető. Tekintve azonban a termékenyülés összetett biológiai folyamatát, ez aligha valósítható meg (Amann és Hammerstedt, 1993). A spermavizsgálatok realiztikus célja a szubfertilis/infertilis egyedek, illetve nem megfelelő minőségű termékenyítő anyagok biztos kiszűrése vagy az adott feldolgozási (spermavételi, hígítási, fagyasztási, tárolási)

technológia esetleges gyenge pontjainak felismerése. Figyelembe kell vennünk, hogy a sikeres termékenyítés érdekében az egyes ondósejteknek több szempontból is megfelelőnek kell lenniük (multiparaméteres tesztek!), illetve az adott termékenyítő adagban megfelelő számban kell ilyen sejteknek lenniük (sejtszintű vizsgálatok!).

## 1.2. JELEN DOLGOZAT CÉLKITŰZÉSEI

A dolgozatban foglalt kísérletek célkitűzései az alábbiak voltak:

- Egy fénymikroszkópos, multiparaméteres spermavizsgálati módszer, a Kovács-Foote féle vitális + akroszómafestés alkalmazhatóságának vizsgálata a spermiumok farokmembránjának értékelése szempontjából (2. fejezet).
- A farokfestődés és a motilitás közötti összefüggések vizsgálata (3. fejezet).
- Az élő/elhalt+akroszómafestés összehasonlítása flow citométeres vizsgálatokkal (4. fejezet).
- Rutinszerűen alkalmazható flow citometriás festési eljárás kidolgozása tojássárgája-tartalmú hígítóban feldolgozott spermaminták értékelésére (5. fejezet).

### 1.3. IRODALOM

1. Aalseth EP and Saacke RG. Vital staining and acrosomal evaluation of bovine sperm. *Gamete Res* 15:73-81 (1986)
2. Amann RP. Relationships between computerized evaluations of spermatozoal motion and competitive fertility index. *Proc 12<sup>th</sup> Tech Conf AI and Reproduction* 38-44 (1988)
3. Amann RP and Graham JK. Spermatozoal function. In: McKinnon AO, Voss JL (eds.) *Equine reproduction*. Lea & Febiger, Philadelphia, London 1993, pp. 715-745.
4. Amann RP and Hammerstedt RH. In vitro evaluation of sperm quality: an opinion. *J Androl* 14 (6): 397-406 (1993)
5. Auger J, Ronot X and Dadoune JP. Human sperm mitochondrial function related to motility: a flow and image cytometric assessment. *J Androl* 10:439-448 (1989)
6. Baccetti B, Braga G, Burrini AG, Collodel G, Constantino-Ceccarini E, Estenoz M, Gatti G, Giordano R, Magnano AR, Piomboni P, Renieri T and Solazzo D. Molecular probes for testing bovine sperm quality. in: "Embryonic development and manipulation in animal production: Trends in research and application" Lauria A and Gandolfi F (eds.). Portland Press Ltd. London, 1992, pp. 37-49.
7. Barth AD and Oko RJ. *Abnormal morphology of bovine spermatozoa*. Iowa Univ Press, Ames, Iowa, USA. 285 pages (1989)
8. Becze J (szerk.). *A hímivarú állatok szaporodásbiológiája*. Mezőgazdasági Kiadó, Budapest, 1983.

9. Blom E. A one-minute live-dead stain by means of eosin-nigrosin. *Fertil Steril* 1:176-177 (1950)
10. Boersma A und Braun J. Computerassistierte Untersuchung der Spermienmorphologie in der Tiermedizin. *Berl Münch Tierärztl Wschr* 112:81-85 (1999)
11. Brady DE and Gidlow EM. Characteristics of ram semen as influenced by the method of collection. *Proc Am Soc Animal Production* (1939)
12. Carter RA, Ericsson SA, Corn CD, Weyerts PR, Dart MG, Escue SG and Mesta J. Assessing the fertility potential of equine semen samples using the reducible dyes methylene green and resazurin. *Arc Androl* 40:59-66 (1998)
13. Chacarov EL and Mollova MV. A one-act differential stain of the acrosome with active dyes. *J Reprod Fert* 48:245-246 (1976)
14. Collins AM and Donoghue AM. Viability assessment of honey bee, *Apis mellifera* sperm using dual fluorescent staining. *Therio* 51:1513-1523 (1999)
15. Correa JR and Zavos PM. The Hypoosmotic Swelling Test: its employment as an assay to evaluate the functional integrity of the frozen-thawed bovine sperm membrane. *Therio* 42:351-360 (1994)
16. Crooke AC and Mandl AM. A rapid supra-vital staining method for assessing the viability of human spermatozoa. *Nature* 159:749 (1947)
17. Cross NL and Meizel S. Methods for evaluating the acrosomal status of mammalian sperm. *Biol Reprod* 41:635-641 (1989)
18. Dart MG, Mesta J, Crenshaw CC and Ericsson SA. Modified resazurin reduction test for determining the fertility potential of bovine spermatozoa. *Arch Androl* 33:71-75 (1994)



19. Didion BA and Graves CN. In vivo capacitation and acrosome reaction of bovine sperm in estrous and diestrous cows. *J Anim Sci* 62:1029-133 (1986)
20. Donoghue AM, Garner DL, Donoghue DJ and Johnson LA. Viability assessment of turkey sperm using fluorescent staining and flow cytometry. *Poultry Sci* 74:1191-1200 (1995)
21. Drevius LO. Spiralization in tails of mammalian spermatozoa in hypotonic media. *Nature* 197:1123-1124 (1963)
22. Dudenhausen E and Talbot P. Detection and kinetics of the normal acrosome reaction of mouse sperm. *Gamete Res* 6:257-265 (1982)
23. Dumont P. Terminology of semen assessment: an attempt to define "live", "motile" and "progressive" sperm cell. *European AI Vets – 10<sup>th</sup> Meeting*. 28-30 October 1998 – Bruges – Belgium.
24. Evenson DP, Darzynkiewicz Z and Melamed MR. Simultaneous measurement by flow cytometry of sperm cell viability and mitochondrial membrane potential related to cell motility. *J Histochem Cytochem* 30:279-280 (1982)
25. Evenson DP, Parks JE, Kaproth MT and Jost LK. Rapid determination of sperm cell concentration in bovine semen by flow cytometry. *J Dairy Sci* 76:86-94 (1993)
26. Farrell PB, Foote RH and Zinaman MJ. Motility and other characteristics of human sperm can be measured by computer-assisted sperm analysis of samples stained with Hoechst 33342. *Fertil Steril* 66:446-453 (1996)
27. Foote RH. Semen quality from the bull to the freezer: an assessment. *Therio* 3:219-234 (1975)

28. Foote RH. Bull sperm surface "craters" and other aspects of semen quality. *Therio* 51:767-775 (1999)
29. Garner DL, Pinkel D, Johnson LA and Pace MM. assessment of spermatozoal function using dual fluorescent staining and flow cytometric analyses. *Biol Reprod* 34:127-138 (1986)
30. Garner DL, Johnson LA, Yue ST, Roth BL and Haughland RP. Dual DNA staining assessment of bovine sperm viability using SYBR-14 and propidium iodide. *J Androl* 15:620-629 (1994)
31. Garner DL and Johnson LA. Viability assessment of mammalian sperm using SYBR-14 and propidium iodide. *Biol Reprod* 53:276-284 (1995)
32. Garner DL. Ancillary tests of bull semen quality. *Food Animal Practice* 13:313-330 (1997)
33. Garner DL, Thomas CA, Joerg HW, DeJarnette JM and Marshall CE. Fluorometric assessments of mitochondrial function and viability in cryopreserved bovine spermatozoa. *Biol Reprod* 57:1401-1406 (1997)
34. Garner DL and Thomas CA. Organelle-specific probe JC-1 identifies membrane potential differences in the mitochondrial function of bovine sperm. *Mol Reprod Dev* 53:222-229 (1999)
35. Gillan L, Evans G and Maxwell WMC. Capacitation status and fertility of fresh and frozen-thawed ram spermatozoa. *Reprod Fert Dev* 9:481-487 (1997)
36. Graham JK, Kunze E and Hammerstedt RH. Analysis of sperm cell viability, acrosomal integrity and mitochondrial function using flow cytometry. *Biol Reprod* 43, 55-64 (1990)

37. Gravance CG, Garner DL, Baumber J and Ball BA. Assessment of equine sperm mitochondrial function using JC-1. *Therio* 53:1691-1703 (2000)
38. Hammerstedt RH. Evaluation of sperm quality: identification of the subfertile males and courses of action. *Anim Reprod Sci* 42:77-87 (1996)
39. Hirai M, Cerbito WA, Wijayagunawardane MPB, Braun J, Leidl W, Ohosaki K, Matsuzawa T, Miyazawa K and Sato K. The effect of viscosity of semen diluents on motility of bull spermatozoa. *Therio* 47:1463-1478 (1997)
40. Holt WV. Can we predict fertility rates? Making sense of sperm motility. *Reprod Dom Anim* 31 (1):17-25 (1996)
41. Jequier AM and Ukombe EB. Errors inherent in the performance of a routine semen analysis. *British J Urol* 55:434-436 (1983)
42. Jeyendran RS, Van der Ven HH, Perez-Pelaez M, Crabo BG, Zaneveld LJD. Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. *J Reprod Fertil*,70:219-228. (1984)
43. Kovács A and Foote RH. Viability and acrosome staining of bull, boar and rabbit spermatozoa. *Biot Histoc* 67:119-124. (1992)
44. Krause W and Viethen G. Quality assessment of computer-assisted semen analysis (CASA) in the andrology laboratory. *Andrologia* 31:125-129 (1999)
45. Kusunoki H, Yasui T, Kato S and Kanda S. Identification of acrosome-reacted goat spermatozoa by a simplified triple-stain technique. *Jpn J Zootech Sci* 55:832-837 (1984)

46. Kusunoki H, Sakaue M, Kato S and Kanda S. Identification of acrosome-reacted boar spermatozoa by a triple-stain technique *Jpn J Anim Reprod* 33:123-127 (1987)
47. Ladha S, James PS, Clark DC, Howes EA and Jones R. Lateral mobility of plasma membrane lipids in bull spermatozoa: heterogeneity between surface domains and rigidification following cell death. *J Cell Sci* 110:1041-1050 (1997)
48. Larson JL and Miller DJ. Simple histochemical stain for acrosomes on sperm from several species. *Mol Reprod Dev* 52:445-449 (1999)
49. Lasley JF, Easley GT and McKenzie FF. A staining method for the differentiation of live and dead spermatozoa. I. Applicability to the staining of ram spermatozoa. *Anat Rec* 82:167-173 (1942)
50. Martin LM, Crenshaw CC, Dean JA, Dart MG, Purdy PH and Ericsson SA. Determination of the number of motile sperm within an ovine semen sample using resazurin. *Small Ruminant Res* 32:161-165 (1999)
51. Mátyus L, Szabó Jr G, Resli I, Gáspár Jr R and Damjanovich S. Flow cytometric analysis of viability of bull sperm cells. *Acta Biochim Biophys Hung* 19:209-214 (1984)
52. Mesta J, Ericsson SA, Dart MG, Wansley RG and Weyerts PR. Assessment of fertility potential of porcine spermatozoa using the reducible dyes methylene green and resazurin. *J Anim Sci* 73 (suppl 1):26 (1995)
53. Miyazaki R, Fukuda M, Takeuchi H, Itoh S and Takada M. Flow cytometry to evaluate acrosome-reacted sperm. *Arch Androl* 25:243-251 (1990)

54. Mortimer D, Serres C, Mortimer ST and Jouannet P. Influence of image sampling frequency on the perceived movement characteristics of progressively motile human spermatozoa. *Gamete Res* 20: 313-327 (1988)
55. Nagy Gy. A patológiás ondósejtek százalékos aránya és a fertilitás közötti összefüggés. *Magyar Állatorvosok Lapja* 20:72-75 (1965)
56. Neild D, Chaves G, Flores M, Mora N, Beconi M and Agüero A. Hypoosmotic test in equine spermatozoa. *Therio* 51:721-727 (1999)
57. Oettlé EE. Using a new acrosome stain to evaluate sperm morphology. *Food Animal Practice* 263-266 (1986)
58. Pajor L és Pásztory Cs. Alternatív áramlási citometriás módszer bovin spermiumok életképességének vizsgálatára. *Magyar Állatorvosok Lapja* 46:593-598 (1991)
59. Papaioannou KZ, Murphy RP, Monks RS, Hynes N, Ryan MP, Boland MP and Roche JF. Assessment of viability and mitochondrial function of equine spermatozoa using double staining and flow cytometry. *Therio* 48:299-312 (1997)
60. Parks JE. Applications of flow cytometry in semen processing and handling. *Proc 14<sup>th</sup> Tech Conf AI and Reproduction* 12-17 (1992)
61. Pena AI, Quintela LA and Herradón PG. Flow cytometric assessment of acrosomal status and viability of dog spermatozoa. *Reprod Dom Anim* 34:495-502 (1999)
62. Pena A, Johannison A and Linde-Forsberg C. Post-thaw evaluation of dog spermatozoa using new triple fluorescent stain and flow cytometry. *Therio* 52:965-980 (1999)

63. Rauhaus H. Untersuchungen zur Morphologie und Lebend-Tot-Färbung von Spermien einiger Haustierarten. Inaugural-Dissertation, München (1990)
64. Robertson L, Wolf DP and Tash JS. Temporal changes in motility parameters related to acrosomal status: identification and characterization of populations of hyperactivated human sperm. *Biol Reprod* 39:797-805 (1988)
65. Saacke RG and Marshall CE. Observations on the acrosomal cap of fixed and unfixed bovine spermatozoa. *J Reprod Fert* 16:511-514 (1968)
66. Sarlós P és Wekerle L. Festési módszerek összehasonlító értékelése a sertéskanspermiumok morfológiai vizsgálatában. *Magyar Állatorvosok Lapja* 45:533-537 (1990)
67. Schäfer S and Holzmann A. The use of transmigration and Spermac stain to evaluate epididymal cat spermatozoa. *Anim Reprod Sci* 59:201-211 (2000)
68. Shaffer HE and Almquist JO. Vital staining of bovine spermatozoa with an eosin-aniline blue staining mixture. *J Dairy Sci* 31:677-678 (1948)
69. Shapiro HM. Multistation multiparameter flow cytometry: a critical review and rationale. *Cytometry* 3:227-243 (1983)
70. Sutovsky P, Navara CS and Schatten G. The fate of sperm mitochondria and the incorporation, conversion and disassembly of the sperm tail structures during bovine fertilization in vitro. *Biol Reprod* 55:1195-1205 (1996)

71. Swanson EW and Bearden HJ. An eosin-nigrosin stain for differentiating live and dead bovine spermatozoa. *J Anim Sci* 10:981-987 (1951)
72. Szász F, Sirivaidyapong S, Cheng FP, Voorhout WF, Marks A, Colenbrander B, Solti L and Gadella BM. Detection of calcium ionophore induced membrane changes in dog sperm as a simple method to predict the cryopreservability of dog semen. *Mol Reprod Dev* 55:289-298 (2000)
73. Szöllősi J, Takács T, Balázs M, Gáspár R, Mátyus L, Szabó G, Trón L, Resli I és Damjanovich S. A bikaondó áramlási citometriás mérése. I. Hígított ondóminták spermiumszámának objektív meghatározása. *Magyar Állatorvosok Lapja* 41:459-463 (1986)
74. Szöllősi J, Takács T, Balázs M, Gáspár R, Mátyus L, Szabó G, Trón L, Resli I és Damjanovich S. A bikaondó áramlási citometriás mérése. II. Az élő-élettelen spermium-szubpopulációk kimutatása ondómintákban. *Magyar Állatorvosok Lapja* 41:731-736 (1986)
75. Talbot P and Chacon RS. A triple-stain technique for evaluating normal acrosome reactions of human sperm. *J Exp Zool* 215:201-208 (1981)
76. Tamuli MK and Watson PF. Use of a simple staining technique to distinguish acrosomal changes in the live sperm sub-population. *Anim Reprod Sci* 35:247-254 (1994)
77. Tao J, Critser ES and Critser JK. Evaluation of mouse sperm acrosomal status and viability by flow cytometry. *Mol Reprod Dev* 36:183-194 (1993)

78. Thomas CA, Garner DL, DeJarnette JM and Marshall CE. Fluorometric assessments of acrosomal integrity and viability in cryopreserved bovine spermatozoa. *Biol Reprod* 56:991-998 (1997)
79. Valcárcel A, de las Heras MA, Pérez L, Moses DF and Baldassare H. Assessment of the acrosomal status of membrane-intact ram spermatozoa after freezing and thawing, by simultaneous lectin/Hoechst 33258 staining. *Anim Reprod Sci* 45:299-309 (1997)
80. Varner DD, Ward CR, Storey BT and Kenney RM. Induction and characterization of acrosome reaction in equine sperm. *Am J Vet Res* 48:1383-1389 (1987)
81. Vazquez JM, Martinez EA, Martinez P, Garcia-Artiga C and Roca J. Hypoosmotic swelling of boar spermatozoa compared to other methods for analysing the sperm membrane. *Therio* 47:913-922 (1997)
82. Vetter CM, Miller JE, Crawford LM, Armstrong MJ, Clair JH, Conner MW, Wise LD and Skopek TR. Comparison of motility and membrane integrity to assess rat sperm viability. *Reprod Toxicol* 12:105-114 (1998)
83. Watson PF. Use of a Giemsa stain to detect changes in acrosomes of frozen ram spermatozoa. *Vet Rec* 97:12-15 (1975)
84. Watson PF. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thaw function. *Reprod Fert Dev* 7:871-891 (1995)
85. Wells ME and Awa OA. New technique for assessing acrosomal characteristics of spermatozoa. *J Dairy Sci* 53 (2):227-232 (1970)



86. Williams WW and Savage A. Methods of determining the reproductive health and fertility of bulls: A review with additional notes. Cornell Vet 17:374 (1927)

## 2. FEJEZET

### A SPERMIMUMFAROK-MEMBRÁN ÉRTÉKELÉSE FÉNYMIKROSKÓP SEGÍTSÉGÉVEL

#### 2.1. BEVEZETÉS

A spermiumfej apikális és kaudális felületeit, a farokrész közép- és fődarabját borító plazmamembrán egyes alterületei eltérő szerepet játszanak az ondósejtek funkciója és túlélése szempontjából. Ezek a strukturális alegységek különböző módon reagálnak a folyékony- vagy fagyasztott állapotban való tárolás során fellépő olyan hatásokra, mint például a hőstressz, vagy az ozmotikus sokk.

Az egyes membrán szubdomének eltérő membránpotenciálja, specifikus fehérjeösszetétele, illetve makromolekuláris permeabilitása lehetővé teszi azok elemzését. A spermiumfejet borító plazmamembrán, valamint az akroszóma integritása specifikus festékekkel értékelhető, míg a fark membránjának épsége az úgynevezett Hypoosmotic Swelling Test (HOS, hipoozmotikus teszt, Amann és Graham, 1993, Garner, 1997, Jeyendran és mtsai, 1984, Lindahl és Drevius, 1964) segítségével vizsgálható: az élő spermiumok farki része feltekeredik a hipoozmotikus közegben.

Egyes vitális festékek gyakran hipotóniás oldatban készülnek. A hipotóniás sokk, amit ezek az oldatok okoznak, a spermiumfarkok fődarabjának feltekeredéséről, vagy ritkább esetben a középdarab mögötti elhajlásáról ismerhető fel (Barth, 1994).

A vitális festékekkel festődött, elhalt, illetve nem festődött, így élőnek és motilisanak tekinthető sejtek közötti kapcsolatot többen is vizsgálták (Mayer és mtsai, 1951, Dott és Foster, 1972, Dumont, 1998, Liu és Foote, 1998). Lasley és mtsai (1942) több festetlen, mint motilis sejtet találtak kossperma vizsgálatakor. Kovács és Foote (nem közölt észrevétel, 1991) bikasperma vizsgálata során nagyobb arányban találtak festetlenül maradt sejteket, mint a számítógépes motilitásvizsgáló (CASA) berendezés által meghatározott motilis sejtarány. A jelenséget mind friss, mind hígított sperma vizsgálatakor észlelték.

Friss és fagyasztott/felolvasztott bikasperma Kovács és Foote (1992) módszerével történő rutinszerű vizsgálata során 10-20%-ban találtunk olyan ondósejteket, amelyek feji részének membránja ép volt, de a fark festődött (1. ábra). A jelenséget észleltük kos és kan ejakulátumok értékelésekor is. Hipotézisünk az volt, hogy a festett farkú ondósejtek immotilisak. Ennek igazolására izoozmotikus tripánkék-oldatban inkubált spermiumok motilitását vizsgáltuk, illetve hipoozmotikus tripánkék-oldattal festett keneteken értékeltük a farkfestődés és a hipoozmotikus reakcióval értékelhető membránintegritás kapcsolatát.

## 2.2. ANYAG ÉS MÓDSZER

Az OMT Rt Gödöllői Mesterséges Termékenyítő Állomásán hat bika egy-egy ejakulátumát vizsgáltuk. Az Állattenyésztési és Takarmányozási Kutatóintézet (Herceghalom) hét kos és négy kan spermamintáját bocsátotta rendelkezésünkre.

A festett farki részű sejtek motilitásának vizsgálata során a spermamintákat 0,9% NaCl-oldattal hígítottuk (bika: 100x, kos: 200x, kan: 20x), majd egy cseppet tárgylemezen elkevertünk egy csepp izoozmotikus (300 mosmol/l) tripánkék-oldattal. Ez utóbbi oldat egy rész 2,5% izoozmotikus tripánkék (Sigma T 8154, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) és 9 rész 0,9% NaCl oldat keverékéből állt. Egy csepp sperma-festék keveréket fedőlemez alatt, 400x, illetve 1000x nagyítással értékeltük, 37°C-ra melegített tárgyasztalon. Mintánként legalább öt mikroszkópos mezőt értékeltünk.

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 (egy rész 2,5% izoozmotikus tripánkék és 9 rész desztillált víz keveréke). A festési eljáráshoz használt további vegyszerek a következők voltak:

Fixálóoldat: 86 ml 1N HCl, 14 ml 37% formaldehid-oldat, 0,2 g neutrálvörös (Sigma N 2880).

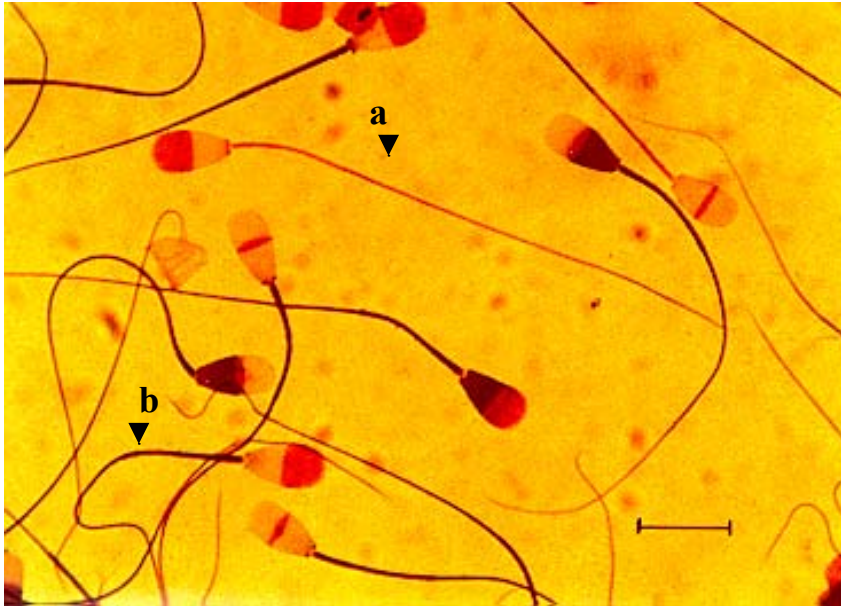
Akroszómafesték: 7,5% Giemsa törzsoldat (Sigma GS 500, desztillált vízben hígítva). A munkaoldatot közvetlenül festés előtt készítettük.

A festést Kovács és Foote (1992) alapján végeztük: szobahőmérsékleten egy csepp tripánkék-oldatot és egy csepp hígított spermát tárgylemezen összekevertük és egy másik tárgylemez segítségével kenetet készítettünk. A kenetek közel vertikális pozícióban száradtak szobahőmérsékleten, majd két percig fixáltuk őket. Csap-és desztillált vizes öblítést követően Giemsa-oldattal festettünk egy éjszakán át. Újabb csap-és desztillált vizes

öblítést követően a keneteket két percre differenciáltattuk desztillált vízben. Végül, a légszáraz keneteket lefedtük kanadabalzsam segítségével. A keneteket 400x nagyítással, fénymikroszkóp segítségével értékeltük. Lemezenként 200 spermiumot osztályoztunk (függetlenül a feji rész membránjának festődésétől) úgy, mint "festetlen és egyenes", "festetlen és görbült", "festett és egyenes", valamint "festett és görbült" farki rész. A festődött és a hipoozmotikus sokkra nem reagáló spermiumfarok-részek közötti kapcsolat leírására regresszióanalízist végeztünk és Pearson korrelációs koefficienszt számoltunk a Microsoft Excel 97 program segítségével.

## EREDMÉNYEK

A vizsgált fajok/egyedek mindegyikénél találtunk ondósejteket festődött farokkal. A posztakroszómális régióban festődött spermiumoknak általában a farki részük is festődött – ezeket a sejteket rutinszerűen "elhaltként" szokás osztályozni. Azon sejtek között azonban, amelyeknek a feji része nem festődött, és így hagyományosan "élőnek" tekintik őket, találtunk festődött és nem festődött farkúakat egyaránt (1. ábra). A spermiumok kis százalékánál a farok középrésze és a fődarabja eltérően festődött, de ezeket minden esetben a "festett" kategóriába soroltuk. A festékoldattal inkubált minták motilitásvizsgálata során festett farkú, aktívan mozgó sejteket nem találtunk.

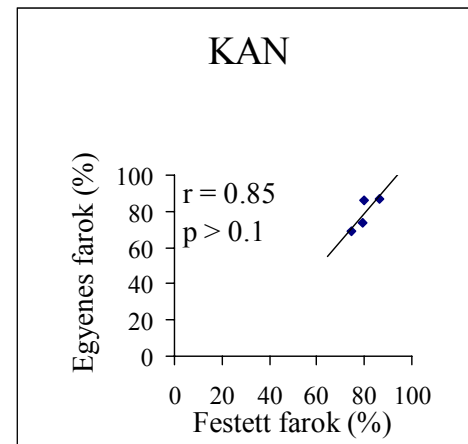
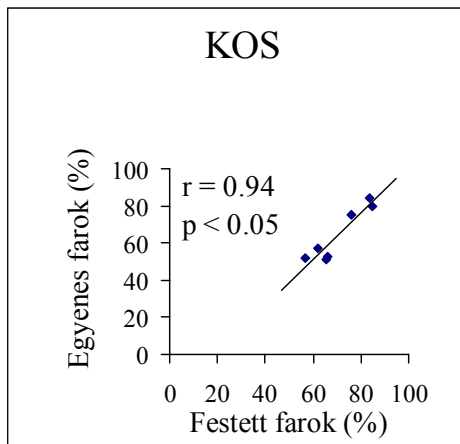
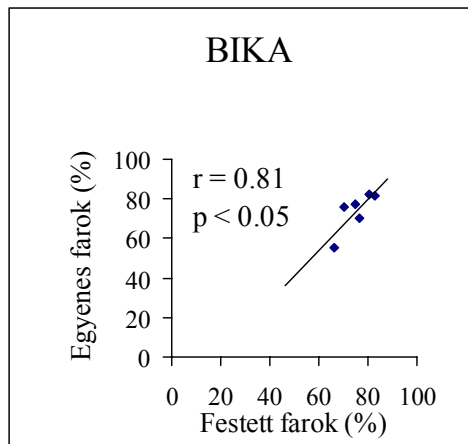


**1. ábra.** Tripánkék-Giemsával festett bikaspermiumok. Vonal: 10  $\mu\text{m}$ .

**a:** Spermium festetlen posztakroszómális régióval és festetlen farkokkal.

**b:** Spermium festetlen posztakroszómális régióval és festett farkokkal.

A vizsgált kenetek eredményeinek statisztikai értékelése szerint a festett farkú ondósejtek és a hipoozmotikus sokkra nem reagáló spermiumok között szoros kapcsolat áll (2. ábra). Bikák és kosok esetében a kapott korrelációs koefficiensek ( $r = 0,81$ , illetve  $0,94$ )  $p < 0,05$  szinten szignifikánsak voltak, hasonló tendencia volt észlelhető ( $p > 0,10$ ) a vizsgált kanok esetében is:  $r = 0,85$ .



**2. ábra.** A festődött, illetve hipoozmotikus sokkra nem reagáló spermiumfarkak közötti

## 2.4. KÖVETKEZTETÉSEK

A vitális spermafestési módszerek évtizedek óta ismertek és használatosak (Smith és Murray, 1997), de a spermiumok farki részének festődéséről kevés említés esik a szakirodalomban (Mayer és mtsai, 1951). A festett kenetokról készült fényképeken egyes esetekben felismerhetőek festett farkú sejtek, de a szerzők nem tárgyalják a jelenséget (Dott és Foster, 1972, Kovács és Foote, 1992, Way és mtsai, 1995).

A festékekkel inkubált spermaminták motilitásvizsgálata során nem találtunk mozgó, festett farkú sejteket. A jelenség dokumentálása fényképeken azonban nem volt megoldható, mivel fáziskontraszttal a festett és festetlen farki részek közötti különbség nem látható, anélkül pedig a festetlenek nem észlelhetők.

Jeyendran és mtsai (1984) kombinálták a HOS tesztet az eozin-nigrozin festéssel. A HOS-ra reagáló sejtek és az eozin Y-nal nem festődő sejtek aránya között  $r = 0,52$  korrelációt találtak. Mivel ők csak a spermiumok fejének festődését értékelték, míg a HOS főleg a fark görbülésével értékelhető, valószínű, hogy egyes ondósejtek feji részének plazmamembránja ép volt, és megakadályozta a festék behatolását, a farkrész azonban, sérült plazmamembránja miatt nem reagált a hipoozmotikus sokkra.

A vitális festékekkel élőnek bíralt és a motilis spermiumok aránya között észlelt különbségek másik valószínű magyarázata a használt festék: a legtöbb festékkombinációban nigrozin használatos kontrasztfestékként, ez azonban sötét háttérrel produkál, ami megnehezíti a farki részek



értékelését. Az egyes vitális festékek, mint a tripánkék, kongóvörös, vagy a különböző eozinok magukban, kontrasztfesték nélkül is háttérképeznek szárítás után. Az általunk használt tripánkék-Giemsza kombináció, különösen a fixálóban lévő neutrálvörös (Sigma N 2880) jelentős mértékben javítja a festődött, illetve festetlenül maradó spermiumfarkak közötti színkülönbséget, továbbá a tárgylemezek ismételt öblítése csökkenti a háttérfestődést, lehetővé téve a farkfestődés észlelését.

Összefoglalva, a festett és a hipoozmotikus közegben nem reagáló farki részek aránya között fennálló szoros kapcsolat három vizsgált faj esetében alátámasztja azt a feltevést, hogy az itt leírt festési technika segítségével a spermiumfarkak membránintegritása értékelhető. Az az ondósejt, amelynek feji plazmamembránja és akroszómája ép ugyan, de a fark plazmamembránja sérült, nem képes mozgásra, így az ilyen sejtek a rutin értékelés során "elhaltnak" tekintendők.

## 2.5. IRODALOM

87. Amann RP and Graham JK. Spermatozoal function. In: McKinnon AO, Voss JL, eds. Equine Reproduction. Lea & Febiger, Philadelphia, London 1993:715-745.
88. Barth AD. Bull Breeding Soundness Evaluation. Manual. Western Canadian Association of Bovine Practitioners, Western College of Veterinary Medicine, University of Saskatchewan, Saskatoon, Canada. (1994)

89. Dott HM and Foster GC. A technique for studying the morphology of mammalian spermatozoa which are eosinophilic in a differential 'live/dead' stain. *J Reprod Fert* 29:443-445 (1972)
90. Dumont P. Terminology of semen assessment: an attempt to define "live", "motile" and "progressive" sperm cell. *European AI Vets – 10<sup>th</sup> Meeting. 28-30 October 1998 – Bruges – Belgium.*
91. Garner DL. Ancillary tests of bull semen quality. *Food Anim Practice* 13:313-330 (1997)
92. Hackett AJ and Macpherson JW. Some staining procedures for spermatozoa. A review. *Can Vet J* 6:55-62 (1965)
93. Jeyendran RS, Van der Ven HH, Perez-Pelaez M, Crabo BG and Zaneveld LJD. Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. *J Reprod Fert* 70:219-228 (1984)
94. Kovács A and Foote RH. Viability and acrosome staining of bull, boar and rabbit spermatozoa. *Biot Histoc* 67:119-124 (1992)
95. Lasley JF, Easley GT and Mackenzie FF. A staining method for differentiation of live and dead spermatozoa. I. Applicability to the staining of ram spermatozoa. *Anat Rec* 82:167-174 (1942)
96. Lindahl PE and Drevious L-O. Observations on bull spermatozoa in a hypotonic medium related to sperm mobility mechanisms. *Exp Cell Res* 36: 632-646 (1964)
97. Liu Z and Foote RH. Bull sperm motility and membrane integrity in media varying in osmolality. *J Dairy Sci* 81:1868-1873. (1998)

98. Mayer DT, Squiers CD, Bogart R. and Oloufa MM. The technique for mammalian spermatozoa as dead or living by differential staining. *J Anim Sci* 10:226-235 (1951)
99. Smith JF and Murray GR. Evaluation of different staining techniques for determination of membrane status in spermatozoa. *Proc New Zealand Soc Anim Prod* 57:246-250 (1997)
100. Way AL, Henault MA and Killian GJ. Comparison of four staining methods for evaluating acrosome status and viability of ejaculated and cauda epididymal bull spermatozoa. *Therio* 43:1301-1316 (1995)

### 3. FEJEZET

## SPERMIMUMOK MOTILITÁSÁNAK ÉS MEMBRÁNINTEGRITÁSÁNAK ÖSSZEHASONLÍTÓ VIZSGÁLATAI

### 3.1. BEVEZETÉS

A spermaminőség megítélésének legrégebbi, és a gyakorlatban máig is leginkább használt módszere a motilis spermiumok arányának mikroszkópos vizuális becslése. A módszer tagadhatatlanul gyors és egyszerű, azonban szubjektív: a vizsgálatok megbízhatóságát nagymértékben befolyásolja a mikroszkóp minősége, a vizsgáló gyakorlata és képességei (Althouse, 1997). Még tapasztalt technikusok is gyakran elfogadhatatlanul nagy eltéréssel értékelik ugyanazt a mintát (Jequier és Ukombe, 1983). Az egyes laboratóriumok és értékelő technikusok közötti variancia elfogadható szintűre csökkentése érdekében a mintavételt standardizálni célszerű (Althouse, 1997), és különös figyelmet kell szentelni a mikroszkóp tárgyasztalának, illetve a tárgylemezek, fedőlemezek egyenletes hőmérsékletére (Birks és mtsai, 1994). Külön figyelembe kell venni, hogy az üvegfelületek és a sperma között fennálló felületi feszültségváltozások is befolyásolják a vizuális értékelést (Molnár, 1962).

Az utóbbi évtizedek technikai és elsősorban számítógépes fejlődése lehetővé tette objektív motilitásvizsgálati módszerek kidolgozását

(Amann, 1988, Holt, 1996). A számítógépes spermavizsgáló berendezések (CASA, computer-assisted semen analysis), nemcsak a mozgó spermiumok arányát, de a mozgás minőségét is értékelni képesek. A CASA berendezéseknek két fő típusa ismert, az egyik utólag értékeli a rögzített felvételeket, a másik azonnali, úgynevezett "real-time" értékelésre képes (Holt, 1996).

Ahogy a dolgozat 2. fejezetében olvasható, a vitális festékekkel végzett membránintegritás-vizsgálatok és a motilitásvizsgálatok eredményei között általában több-kevesebb eltérés található. A 2. fejezetben ismertetett spermiumfarok-festési módszer feltételezhetően közelebbi egyezést mutat a motilitásvizsgálatokkal. Jelen kísérletek célja a Kovács-Foote festés és a számítógépes motilitásértékelés összevetése volt.

## 3.2. ANYAG ÉS MÓDSZER

### 3.2.1. *Spermaminták*

Az OMT Rt Gödöllői Mesterséges Termékenyítő Állomásán termelő kilenc holstein-fríz tenyészbika összesen 36 mélyhűtött spermaadagját vizsgáltuk. A műszalmákat az állomás spermalaborjának rutin technológiája szerint, 37°C hőmérsékletű vízfürdőben 25 másodpercig tartva olvasztottuk fel.

### *3.2.2. Membránintegritás-vizsgálat*

A felolvasztott spermamintákból festett keneteket készítettünk Kovács és Foote (1992) módszere szerint. A festés menete a következő volt:

Egy csepp 0,2% tripánkék munkaoldatot (0,4% tripánkék (T-8140, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) törzsoldat hígítva 1:1 arányban 0,9% NaCl-oldattal) és egy csepp, 0,9% NaCl-oldattal 1:10 arányban hígított spermát tárgylemezen elkevertünk és kenetet készítettünk. A keneteket szobahőmérsékleten közel függőleges pozícióban szárítottuk. A légszáraz keneteket két percig fixáltuk a fixálóoldatban, amely 86 ml 1N HCl, 14 ml 37% formaldehid-oldat és 0,2 g neutrálvörös (Sigma N-2880) keverékéből állt. Fixálást követően a lemezeket csap-majd desztillált vízzel öblítettük. Ezután a keneteket festőpohárban festettük 7,5%-os Giemsa (Sigma GS-500) munkaoldatban szobahőmérsékleten, egy éjszakán át. Újabb csap-és desztilláltvizes öblítés után a keneteket két percig differenciáltattuk desztillált vízben, majd légszárítást követően fedőlemezzel lefedtük a lemezeket. A keneteket fénymikroszkóp segítségével értékeltük 400x nagyítással, kenetenként 200-200 sejtet megszámlálva és a spermiumfej, farok, illetve akroszóma membránállapota alapján osztályozva (dolgozat 2. fejezete, Nagy és mtsai, 1999).

### *3.2.3. Számítógépes motilitásvizsgálat*

A mozgó spermiumok százalékos arányát (MOT%) az állomás spermalaboratóriumában álló HTM 2000 típusú motilitásvizsgáló

berendezés (Hamilton Thorne Research, Beverly, MA, USA) segítségével állapítottuk meg, az egyenletes mintaméret érdekében Makler-kamrát (Sefi-Medical Instruments, Izrael) használva (Szász, 1998).

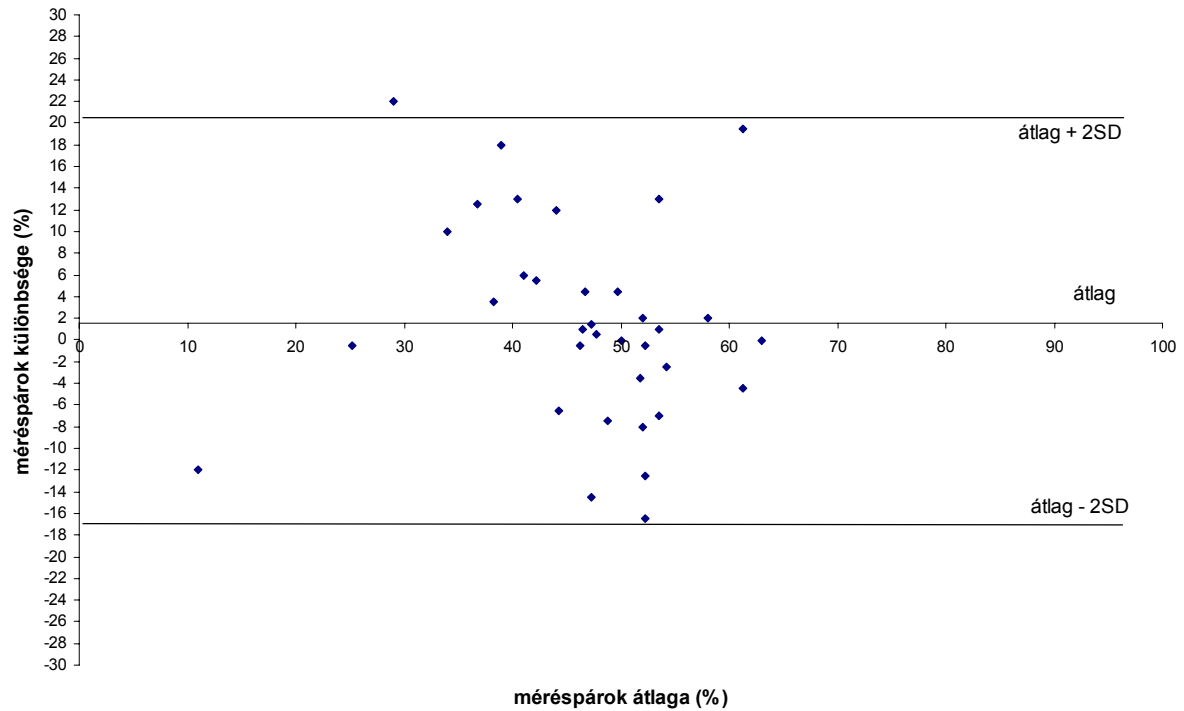
#### *3.2.4. Statisztikai elemzés*

A motilis, illetve ép sejtmembránnal (mind a fej, mind a fark membránját értékelve) és akroszómával bíró ondósejtek százalékos aránya közötti kapcsolatot Bland-Altman ismételtetőségi/módszer-egyetértési próba (Method agreement analysis, Bland és Altman, 1986, Petrie és Watson, 1999) segítségével, a Microsoft Excel 97 programmal elemeztük. A CASA berendezés által megállapított motilitási paraméterek közül a mozgó sejtek arányát (MOT%) vettük figyelembe, mivel az összehasonlító vizsgálatban nem a mozgás minőségére, csupán tényére voltunk kíváncsiak.

### 3.3. EREDMÉNYEK

A vizsgált 36 minta CASA eredményei között egy kiugró értéket találtunk, ezt – valószínű mérési hiba miatt – kizártuk a további elemzésből.

Az 1. ábrán az egyes méréspárok különbségeit ábrázoltuk az átlaguk függvényében. 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.



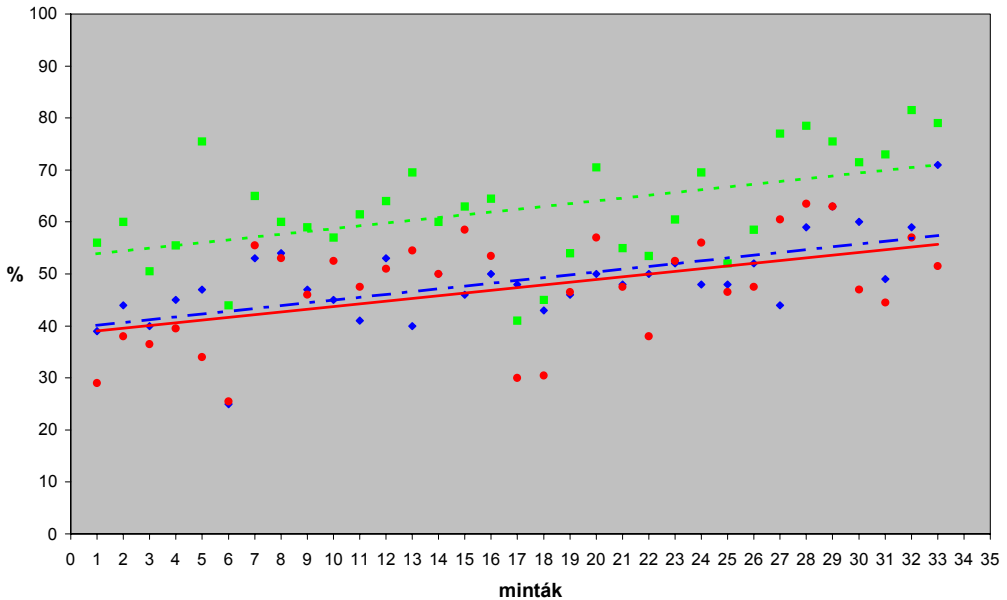
**1. ábra.** A számítógépes motilitásvizsgálat és a Kovács-Foote festés módszer-egyetértési vizsgálata. Mérés párok különbségei az átlaguk függvényében.



### 3.4. KÖVETKEZTETÉSEK

Az egyes módszerekkel kapott átlagértékeket tekintve, közel azonos eredményeket kaptunk, alátámasztva a dolgozat 2. fejezetében felvetett hipotézist (2. ábra), azonban két módszer összehasonlítása átlagszinten félrevezető lehet (Petrie és Watson, 1999). Valóban, az egyes méréspárok eredményei közötti kapcsolat vizsgálatokor nem kaptunk a vártnak megfelelően szoros egyetértési határértékeket. A jelenség egyik valószínű oka a motilitásvizsgáló berendezés beállítási paramétereiben kereshető: az állomás spermalaboratóriumának rutin rendje szerint, a mélyhűtött/felolvasztott mintákat nem hígítottuk a motilitásvizsgálathoz tovább, hanem kb.  $100 \times 10^6/\text{ml}$  koncentráció mellett vizsgáltuk azokat. Mortimer és mtsai (1988) szerint azonban a CASA berendezések a fent említett koncentrációérték mellett alulbecsülik a minta koncentrációját, ebből következően viszont túlbecsülhetik a mozgó sejtek arányát.

Említett szerzők szerint az optimális sejtkoncentráció  $< 40 \times 10^6/\text{ml}$ . Nem szabad azonban figyelmen kívül hagyni, hogy a vizsgálandó spermaminták hígítására általában használt fiziológiás sóoldat motilitásvizsgálatok esetében nem alkalmazható, mivel megváltoztathatja az egyes mozgási paramétereket (Robertson és mtsai, 1988). Alkalmasabb megoldás a spermaminták feldolgozása során használt spermahígító alkalmazása a CASA-vizsgálatokhoz (Boersma és Nagy, nem közölt észrevétel, 2000), azonban ez rutin körülmények között nem mindig valósítható meg (régiminták, más termékenyítő állomásokról származó spermaadagok vizsgálata esetén például).



**2. ábra.** A motilitási, illetve festési eredményekre illesztett lineáris trendvonalak.

- - - MOT%
- ..... festetlen fejjű, ép akroszómájú spermiumok %
- festetlen fejjű és farkú, ép akroszómájú spermiumok %

A használt hígító viszkozitása is befolyásolja a sejtek mozgási paramétereit (Hirai és mtsai, 1997), továbbá a tojássárgája-tartalmú hígítókból található részecskéket a berendezés tévesen nem mozgó spermiumokként értékelheti (Tardif és mtsai, 1996).

További kérdéses pont a mintánkénti mérések száma: Farrell és mtsai (1998) vizsgálatai szerint a mintákat két ismétlésben, ismétlésenként nyolc különböző mezőben, így mintánként 16 mezőt érdemes vizsgálni. Hirai és mtsai (1997) kísérleteikben öt ismétlésben három-három, azaz

összesen 15 mezőt értékelték. Ez azonban jelentősen lelassítja a vizsgálatokat, kérdésessé téve a berendezések rutinszerű alkalmazhatóságát a mesterséges termékenyítő állomásokon friss sperma értékelésére. Mélyhűtött/felolvasztott spermaadagok minőségének vizsgálatára alkalmasabb lehet a műszeres motilitásvizsgálat (bár érdemesnek tartjuk a kísérletünkben használt berendezés beállítási paramétereinek és működtetési protokolljának felülbírálatát). Az egyes motilitási paraméterek és a fertilitás között viszonylag szoros kapcsolat áll fenn (Amann, 1988), de nem szabad elfeledkeznünk arról, hogy a mozgás csak egy a spermiumok sikeres termékenyítéshez szükséges tulajdonságai között (Amann és Graham, 1993). Minden termékenyítőképes spermium mozog (legalábbis természetes körülmények között), de nem minden mozgó spermium képes termékenyítésre.

A fentiekből következően, a Kovács-Foote festés diagnosztikai értékének megállapítását célzó kísérletünk csak tájékoztató jellegűnek tekinthető. A festés objektív, műszeres validálásához további kísérletek szükségesek: a jelen fejezetben leírt kísérlet, illetve a müncheni Ludwig-Maximilian Egyetem Állatorvosi Fakultásának Andrológiai Klinikáján tett tanulmányutam során szerzett tapasztalataimra építve szigorúbban kontrollált összehasonlító vizsgálatokat tervezek.

### 3.5. IRODALOM

1. - . A mesterséges termékenyítésre használt bikákra és kanokra, továbbá azok spermájára vonatkozó előírások. 3. melléklet a 39/1994 (VI. 28.) FM rendelethez
2. Althouse GC. Evaluating porcine semen for artificial insemination. Part I. Standard tests. Food Animal Practice 30-35, January (1997)
3. Amann RP and Graham JK. Spermatozoal function. In: McKinnon AO, Voss JL, eds. Equine reproduction. Lea & Febiger, Philadelphia, London 1993:715-745.
4. Amann RP. Relationships between computerized evaluations of spermatozoal motion and competitive fertility index. Proc 12<sup>th</sup> Tech Conf AI and Reproduction, 38-44 (1988)
5. Birks AG, Izzard H, Morroll DR, Prior JR, Troup SA, Liebermann BA and Matson PL. The routine assessment of sperm motility at room temperature and 37°C. Int J Androl 17:289-291 (1994)
6. Bland JM and Altman DG. Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement. Lancet i:307-310 (1986)
7. Farrell PB, Presicce GA, Brockett CC and Foote RH. Quantification of bull sperm characteristics measured by computer-assisted sperm analysis (CASA) and the relationship to fertility. Therio 49:871-879 (1998)
8. Hirai M, Cerbito WA, Wijayagunawardane MPB, Braun J, Leidl W, Ohosaki K, Matsuzawa T, Miyazawa K and Sato K. The effect of

- viscosity of semen diluents on motility of bull spermatozoa. *Therio* 47:1463-1478 (1997)
9. Holt WV. Can we predict fertility rates? Making sense of sperm motility. *Reprod Dom Anim* 31:17-24 (1996)
  10. Jequier AM and Ukombe EB. Errors inherent in the performance of a routine semen analysis. *British J Urol* 55:434-436 (1983)
  11. Kovács A. and Foote RH. Viability and acrosome staining of bull, boar and rabbit spermatozoa. *Biot Histoc* 67:119-124 (1992)
  12. Molnár J. Általános spermológia. Akadémiai kiadó, Budapest. 252 old. (1962)
  13. Mortimer D, Serres C, Mortimer ST and Jouannet P. Influence of image sampling frequency on the perceived movement characteristics of progressively motile human spermatozoa. *Gamete Res* 20: 313-327 (1988)
  14. Nagy Sz, Házás G, Bali Papp Á, Iváncsics J, Szász F, Szász F Jr. , Kovács A and Foote RH. Evaluation of sperm tail membrane integrity by light microscopy. *Therio* 52:1153-1159 (1999)
  15. Petrie A and Watson P. *Statistics for Veterinary and Animal Science*. Blackwell Science Ltd. 243 pages. (1999)
  16. Robertson L, Wolf DP and Tash JS. Temporal changes in motility parameters related to acrosomal status: identification and characterization of populations of hyperactivated human sperm. *Biol Reprod* 39:797-805 (1988)
  17. Szász F. Spermabírálat. In: Gere T, Soós P és Szász F. *A szarvasmarha mesterséges termékenyítése*. Mezőgazda Kiadó, Budapest. 384 old. (1998)

18. Tardif AL, Farrell PB, Trouern-Trend V and Foote RH. Computer-assisted sperm analysis for assessing initial semen quality and changes during storage at 5°C. *J Dairy Sci* 80:1606-1612 (1997)

## 4. FEJEZET

# SPERMIUMOK MEMBRÁNINTEGRITÁS- VIZSGÁLATA: FÉNYMIKROSKÓPOS ÉS FLOW CITOMÉTERES ÉRTÉKELÉSI MÓDSZEREK ÖSSZEHASONLÍTÁSA RUTIN KÖRÜLMÉNYEK KÖZÖTT

### 4.1. BEVEZETÉS

A mesterséges termékenyítő állomások gyakorlatában – legalábbis hazai szinten – a termelt sperma minőségének vizsgálatára vizuális motilitásvizsgálatot alkalmaznak. Bár a módszer gyors és egyszerű, azonban szubjektív és az ondósejteknek csak egy tulajdonságáról ad információt. Figyelembe véve a rutin munkarendet, a friss sperma feldolgozhatóságának eldöntésére továbbra is ez a legalkalmasabb módszer, a feldolgozott, hígított sperma (az értékesítésre kerülő végtermék!) próbafagyasztás utáni vizsgálatára részletesebb vizsgálatokra van szükség (dolgozat 3. fejezete). Különösen igaz ez az utóbbi idők kutatási eredményeinek figyelembevételével, miszerint a fagyasztás/felolvasztás a spermiumok kapacitációjához, akroszómareakciójához hasonló membránváltozásokat eredményez (Watson, 2000).

A szakirodalomban számos olyan festési eljárás ismert, amely segítségével az akroszóma integritásáról nyerhetünk információt, emellett

az élő/elhalt státusz megállapítása is fontos, a fiziológias és fals akroszómareakció megkülönböztetése érdekében. (öszefoglalja: Smith és Murray, 1997).

A membránintegritás vizsgálatának korszerű módszere az úgynevezett áramlási sejtanalízis, flow citometria. Flow citométer alkalmazásával lehetőségünk nyílik spermaminták multiparaméteres analízisére, több ezer sejt vitalitását és akroszóma-integritását értékelve egy percen belül (Graham és mtsai, 1990, Parks, 1992).

Jelen tanulmány célja volt egy mikroszkópos festési módszer (Kovács és Foote,1992), valamint a leggyakrabban használt fluoreszcens, flow citométerrel értékelhető festékkombináció, fluoreszcein-izotiocianáttal konjugált földimogyoró agglutinin és propidium-jodid (FITC-PNA/PI) összehasonlító értékelése, elsősorban a rutinszerű alkalmazhatóság szempontjából, a fagyasztott/felolvasztott spermaminták minőségének ellenőrzésére.

## 4.2. ANYAG ÉS MÓDSZER

### 4.2.1. Vegyszerek

A kísérletekben használt vegyszereket az alábbi forrásokból szereztük be: Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA): tripánkék T-8154, neutrálvörös N-2880, Giemsa GS-500, dimetil-szulfoxid (DMSO) D-5879.

Merck (Darmstadt , Németország): Entellan lefedő közeg 1.07960.



Becton Dickinson (San José, CA, USA): Cell WASH optimizált PBS 349524.

Molecular Probes Inc. (Eugene, OR, USA): propidium-jodid (PI), a LIVE/DEAD Sperm Viability Kit (L-7011) B komponense.

#### *4.2.2. Spermaminták*

Egy holland mesterséges termékenyítő állomáson termelő tíz holstein-fríz bika két-két ejakulátumát vizsgáltuk. Az ejakulátumok az adott mesterséges termékenyítő állomás rutin technológiája szerint kerültek feldolgozásra és fagyasztásra TRIS-homogenizált tojássárgája hígítóban. Felolvasztás után (egy perc 37°C-os vízfürdőben, az állomás rutin technológiája szerint) minden egyes ejakulátumból három-három almintát vettünk, ezek négy-négy műszalma keverékéből álltak. Az almintákat két ismétlésben vizsgáltuk.

#### *4.2.3. Fénymikroszkópos értékelés*

Kovács-Foote festés (Kovács és Foote, 1992):

Egy csepp 0,2% tripánkék munkaoldatot (0,4% tripánkék tözsoldat hígítva 1:1 arányban 0,9% NaCl-oldattal) és egy csepp, 0,9% NaCl-oldattal 1:10 arányban hígított spermát tárgylemezen elkevertünk és kenetet készítettünk. A keneteket szobahőmérsékleten közel függőleges pozícióban szárítottuk. A légszáraz keneteket két percig fixáltuk a fixálóoldatban, amely 86 ml 1 N HCl, 14 ml 37% formaldehid-oldat és

0,2 g neutrálvörös keverékéből állt. Fixálást követően a lemezeket csapmajd desztillált vízzel öblítettük. Ezt követően a keneteket festőpohárban festettük 7,5%-os Giemsa munkaoldatban szobahőmérsékleten, egy éjszakán át. Újabb csap-és desztillált vizes öblítést követően a keneteket két percig differenciáltattuk desztillált vízben, majd légszárítást követően fedőlemezzel lefedtük a lemezeket. A keneteket fénymikroszkóppal értékeltük 400x nagyítással, kenetenként 200-200 sejtet megszámlálva és a spermiumfej, farok, illetve akroszóma membránállapota alapján osztályozva (dolgozat 2. fejezete, Nagy és mtsai, 1999).

#### *4.2.4. Flow citometria*

FITC-PNA/PI festés:

Festékoldatok:

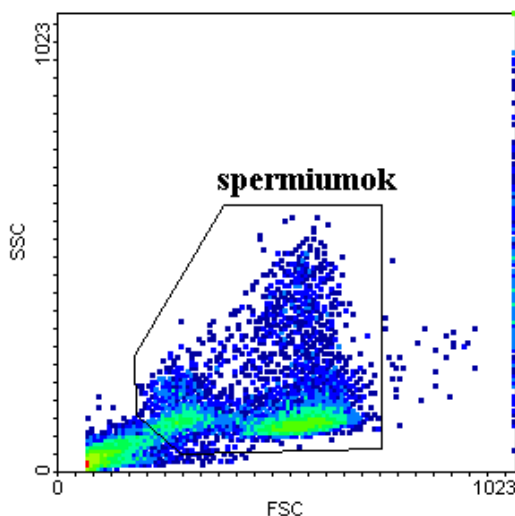
FITC-PNA: 1 mg/ml törzsoldat DMSO-ban. Munkaoldat: továbbhígítva PBS-el 200 $\mu$ g/ml koncentrációra.

PI: LIVE/DEAD Sperm Viability Kit hígítatlan B komponense.

Festési eljárás:

A spermamintákat 10x hígítottuk CellWASH optimizált PBS-el. Egy ml mintához 5  $\mu$ l PI-oldatot és 5  $\mu$ l FITC-PNA munkaoldatot adtunk, így a végső lektinkoncentráció 1  $\mu$ g/ml volt (Flesch és mtsai, 1998). A mintákat 37°C-on, sötétben inkubáltuk 5 percig. Citométeres elemzés előtt a mintákat felkevertük.

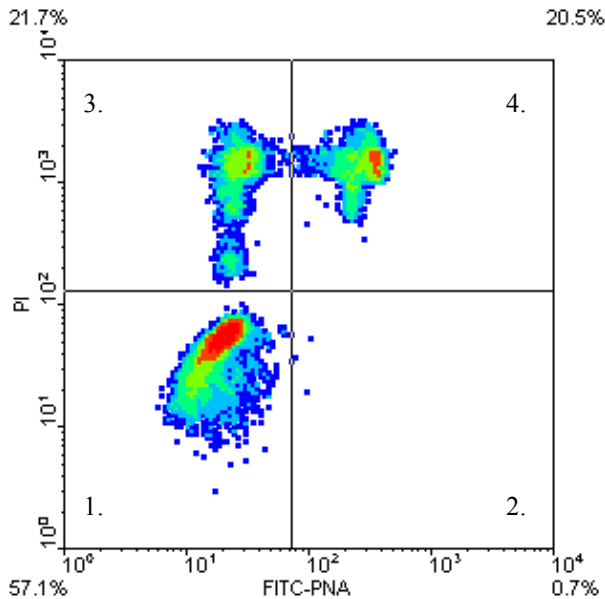
A méréseket FACSCalibur kétlézeres flow citométerrel (Becton Dickinson, San José, CA, USA) végeztük. A berendezést naponta kalibráltuk CaliBrite 3 kit segítségével (Becton Dickinson, 340486). A fluoreszcens festékek gerjesztése 15mW-os argon ion lézer segítségével történt, 488 nm-en. A zöld fluoreszcens jeleket (FITC-PNA) az FL 1 (530/30 nm) fotoelektron-sokszorozó detektoron, a vörös fluoreszcens jeleket (PI) pedig az FL 3 (670 nm LP) detektoron észleltük. A mért 0- és 90°-os szórtfény-intenzitási értékek (forward scatter FSC, side scatter SSC) alapján különböztettük meg a spermiumokat a sejtörmeléktől, illetve sejtaggregátumoktól (1. ábra).



**1. ábra.** Fagyasztott/felolvasztott spermiumpopuláció jellemző szórtfényintenzitási képe dot-plot citogramon. A régiótól jobbra sejtaggregátumok, balra a hígítóban található tojássárgája-szemcsék és egyéb sejtörmelék található. A spermiumpopuláció nem különíthető el ez utóbbtól tökéletesen.

Mintánként 10 000 sejt fluoreszcens adatait gyűjtöttük össze és analizáltuk dot-plot citogram formában, a CellQuest 3.3 (Becton Dickinson) program segítségével. A mért fluoreszcencia-intenzitások alapján az alábbi négy spermium-szubpopulációt különböztettük meg (2. ábra):

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



**2. ábra.** FITC-PNA/PI festett spermaminta jellemző dot-plot citogramja.

#### *4.2.5. Statisztikai értékelés*

A Kovács-Foote festés, illetve a FITC-PNA/PI módszer ismételtetését, valamint a két festési eljárás közötti kapcsolatot Bland-Altman ismételtetés/módszer-egyetértési próba (Method agreement analysis, Bland és Altman, 1986, Petrie és Watson, 1999) segítségével, a Microsoft Excel 97 programmal elemeztük. A két teszt eredményeinek összehasonlítására az első mérési ismétléseket állítottuk párba és hasonlítottuk össze (Bland és Altman, 1986).

### 4.3. EREDMÉNYEK

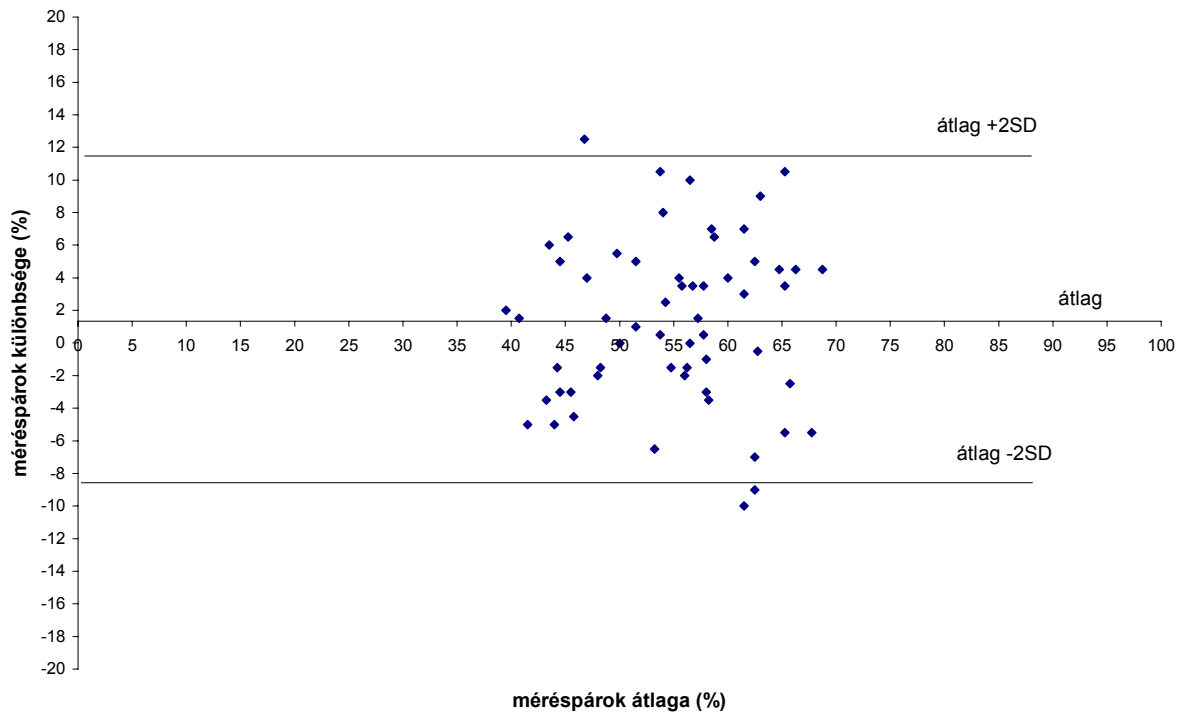
#### *4.3.1. Ismételtetés vizsgálatok*

##### Kovács-Foote festés

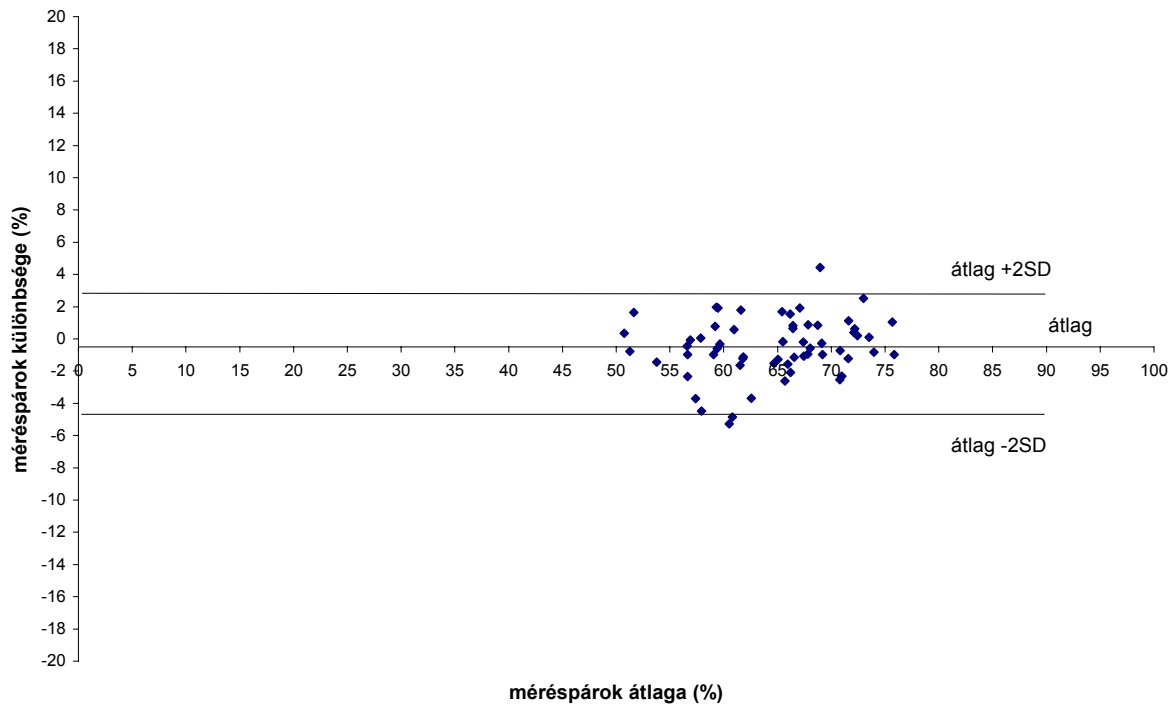
Az ismételtetés vizsgálat alapját az élő, ép akroszómájú és festetlen farkú spermiumok százalékos aránya képezte. Az ismételt mérések közötti átlagos eltérés  $d = 1,35\%$ , a szórás  $SD = 5,09\%$ , a British Standard ismételtetés koefficiens  $2SD = 10,18\%$  volt (3. ábra).

##### FITC-PNA/PI

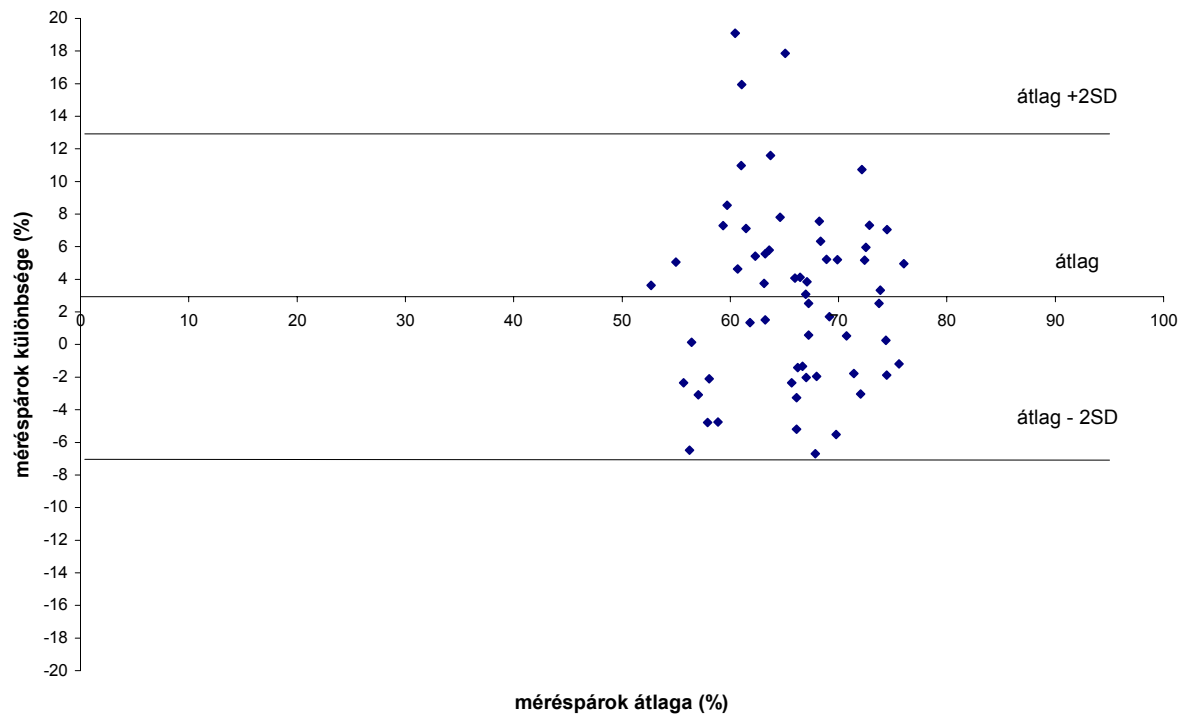
Az ismételt mérések közötti átlagos eltérés  $d = -0,49\%$ , a szórás  $SD = 1,82\%$ , a British Standard Institution ismételtetés koefficiens  $2SD = 3,64\%$  volt (4. ábra).



**3. ábra.** Kovács-Foote festés ismételhetőségi vizsgálata. Ismételt mérések különbségei az átlaguk függvényében.



**4. ábra.** Flow citométeres FITC-PNA/PI festés ismételhetőségi vizsgálata. Ismételt mérések különbségei az átlaguk függvényében.



**5. ábra.** A Kovács-Foote festés és a FITC-PNA/PI festés módszer-egyetértési vizsgálata. Mérés párok különbségei az átlaguk függvényében.



#### 4.3.2. Módszer-egyetértési analízis

Mivel a fluoreszcens festési módszer csak a spermiumfej membránjának és akroszómának az állapotáról ad információt, az összehasonlító analízis során a Kovács-Foote minták elemzésekor nem vettük figyelembe a spermiumfarok membánállapotát. A Kovács-Foote – FITC-PNA/PI méréspárok közötti átlagos eltérés  $d = 2,95\%$ , a szórás  $SD = 5,7\%$ , a 95%-os egyetértési határok  $d \pm 2SD = (-7,19\%; 13,09\%)$  voltak (5. ábra).

#### 4.4. KÖVETKEZTETÉSEK

Az ismételhetőségi koefficiensek értelmezésekor nem szabad figyelmen kívül hagynunk, hogy a mikroszkópos értékelés során 200 sejtről nyerünk információt, míg a citométer 10 000 spermiumot értékel. Ennek fényében, illetve figyelembe véve, hogy például a spermiumkoncentráció meghatározására "standardként" használt mikroszkópos, hemacitóméteres (pl. Bürker-kamrás) sejtszámlálás is kb. 10% hibával terhelt, a Kovács-Foote festés esetében kapott eredmények elfogadható ismételhetőséget mutatnak. Természetesen, több sejt számlálásával az ismételhetőség javítható, de a jelen tanulmány célja a festési módszer rutin körülmények közötti tesztelése volt, és a mesterséges termékenyítő állomásokon általában 100-200 sejtet értékelnek mintánként.

A flow citométeres módszer a vártnak megfelelően nagyfokú ismételhetőséget mutatott. Ilyen nagyfokú precizitás mellett az ismételt mérések közötti eltérés legfőbb okai a minta-előkészítésben kereshetők, mint például a nem teljesen egyenletes felkeverés, pipettázási hibák, stb.

Mivel a fluoreszcens festékek többsége fény hatására veszít intenzitásából, ugyanazon csövek ismételt leolvasását nem láttuk célszerűnek beépíteni a kísérletbe. További hibaforrás lehet az általunk használt festékkombináció esetében a hígítóban jelenlévő tojássárgája is: mivel a FITC-PNA csak a sérült/reaktált akroszómákat jelöli, a PI pedig csak az elhalt sejteket festi, a számunkra legérdekesebb sejtpopuláció, az élő sejtek ép akroszómával festetlenek maradnak. Ezek viszont a szórófény-intenzitás alapján nem különíthetők el tökéletesen a szintén festetlen és hasonló méretű tojássárgája-szemcséktől (2. ábra). A korábbi citométeres tanulmányok többségében friss spermát vizsgáltak a szerzők (Graham és mtsai, 1990, Miyazaki és mtsai, 1990, Pena és mtsai, 1999a), így a problémáról kevés említés esik a vonatkozó szakirodalomban (Pena és mtsai, 1999b). Standard módszer hiányában kalibrációs görbét nem tudunk készíteni, így viszont nem kapunk információt a citométeres vizsgálat pontosságáról (accuracy), csupán azt állíthatjuk, hogy rendkívül precíz.

A két értékelési mód összehasonlításakor, a fent leírtak figyelembevételével, megállapíthatjuk, hogy – legalábbis a spermiumfej membránjának és az akroszóma integritásának vizsgálatára – a Kovács-Foote festés megbízhatóan alkalmas. Sajnos, jelen pillanatban nem áll rendelkezésünkre a farokmembrán értékelésére alkalmas flow citométeres módszer, így a Kovács-Foote módszer farokfestését nem tudtuk citométerrel validálni. A kérdés megoldása további kutatást igényel.

Összességében megállapítható, hogy mindkét módszer beépíthető a mesterséges termékenyítő állomások spermalaboratóriumának rutin

munkarendjébe. A Kovács-Foote festés előnye, hogy több sejtsejtről ad információt (fej, farok, akroszóma), olcsóbb, eszközigénye kisebb, nem igényel olyan szintű szaktudást, mint a flow citométer üzemeltetése. Flow citométer használatával viszont jóval precízebb képet kapunk a vizsgált mintákról, a módszer pedig rendkívül gyors (1000-2000 sejt értékelése másodpercenként).

#### 4.5. IRODALOM

1. Bland JM and Altman DG. Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement. *Lancet* i:307-310 (1986)
2. Flesch FM, Voorhout WF, Colenbrander B, van Golde LMG and Gadella BM. Use of lectins to characterize plasma membrane preparations from boar spermatozoa: a novel technique for monitoring membrane purity and quantity. *Biol Reprod* 59:1530-1539 (1998)
3. Graham JK, Kunze E and Hammerstedt RH. Analysis of sperm cell viability, acrosomal integrity and mitochondrial function using flow cytometry. *Biol Reprod* 43:55-64 (1990)
4. Kovács A. and Foote RH. Viability and acrosome staining of bull, boar and rabbit spermatozoa. *Biot Histochem* 67:119-124 (1992)

5. Miyazaki R, Fukuda M, Takeuchi H, Itoh S and Takada M. Flow cytometry to evaluate acrosome-reacted sperm. Arch Androl 25:243-251 (1990)
6. Nagy Sz, Házás G, Bali Papp Á, Iváncsics J, Szász F, Szász F Jr. , Kovács A and Foote RH. Evaluation of sperm tail membrane integrity by light microscopy. Therio 52:1153-1159 (1999)
7. Parks JE. Applications of flow cytometry in semen processing and handling. Proc 14<sup>th</sup> Tech Conf AI & Reproduction. 12-17 (1992)
8. Pena AI, Quintela LA and Herradon PG. Flow cytometric assessment of acrosomal status and viability of dog spermatozoa. Reprod Dom Anim 34:495-502 (1999)
9. Pena A, Johannisson A and Linde-Forsberg C. Post-thaw evaluation of dog spermatozoa using new triple fluorescent staining and flow cytometry. Therio 52:965-980 (1999)
10. Petrie A and Watson P. Statistics for Veterinary and Animal Science. Blackwell Science Ltd. 243 pages. (1999)
11. Smith JF and Murray GR. Evaluation of different staining techniques for determination of membrane status in spermatozoa. Proc New Zealand Soc Anim Prod 57:246-250. (1997)

12. Watson PF. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Anim Reprod Sci* 60-61: 481-492 (2000)

## 5. FEJEZET

# BIKASPERMIUMOK MEMBRÁN-ÉS AKROSZÓMAINTEGRITÁSÁNAK FLOW CITOMÉTERES ÉRTÉKELÉSE ÚJ FESTÉKKOMBINÁCIÓ SEGÍTSÉGÉVEL

### 5.1. BEVEZETÉS

A spermaminőség rutinszerű értékelése alapvető jelentőségű mind a mesterséges termékenyítő állomásokon, mind a humán andrológiai klinikákon. A többnyire mikroszkóp segítségével végzett vizsgálatok azonban csak a spermiumok egy-két – a termékenyítés szempontjából lényeges – tulajdonságát célozzák, mint a sejtek motilitása, esetleg morfológiája. Mivel a spermiumoknak a sikeres termékenyítéshez több szempontból is meg kell felelniük, az ideális in vitro spermavizsgálati módszer egyidejűleg, sejtszinten minősítené az ondósejtek termékenyítéshez szükséges paramétereit (Amann és Hammerstedt, 1993).

A flow citometria (áramlási sejtanalízis) rövid idő alatt nagyszámú sejt vizsgálatát teszi lehetővé, több tulajdonság egyidejű értékelésével (Hammerstedt, 1996). Számos publikáció ismerteti a flow citométerek használhatóságát a spermakonzentráció, kromatinstruktúra, élősejt-arány, illetve az akroszóma integritásának vizsgálatában (összefoglalja Parks, 1992). A leírt módszerek azonban gyakran biológiai alap kutatások

eszközéül szolgálnak, így a gyakorlati felhasználhatóság szempontjából túl bonyolultak és időigényesek.

Az akroszóma és a plazmamembrán épségének egyidejű citométeres vizsgálatára leggyakrabban használt fluoreszcens festékkombináció a fluoreszcein-izotiocianáttal konjugált borsó (*Pisum sativum*) agglutinin, FITC-PSA, amely az akroszómális matrixhoz kötődve jelzi az akroszóma ép/sérült állapotát, míg kontrasztfestékként a DNS-specifikus propidium-jodid (PI) használatos, amely csak a sérült plazmamembránon képes átjutni, így az elhalt sejteket jelöli (Graham és mtsai, 1990). FITC-PSA-val festve, az ép akroszómával bíró spermiumok nem, a sérült, vagy reaktált akroszómájú sejtek zölden fluoreszkálnak. PI-dal jelölve, az élő sejtek nem, az elhalt sejtek vörösen fluoreszkálnak. Tojássárgája-alapú hígítóval feldolgozott spermaminták vizsgálatakor problémát jelenthet, hogy a tojássárgája-cseppek és egyéb sejtörmelék hasonló morfológiai paramétereket mutat, mint a nem fluoreszkáló élő, ép akroszómájú ondósejtek, így a citométer túlbecsüli ezen utóbbi spermiumszubpopulációt (Pena és mtsai, 1999, dolgozat 4. fejezete). A probléma megoldására Thomas és mtsai (1997) a DNS-specifikus SYTO 17 festéket kombinálták FITC-PNA-val és PI-dal, így a DNS-tartalom alapján az ondósejtek jól elkülöníthetők voltak. A földimogyoró (*Arachis hypogea*) agglutinin (PNA), az akroszóma külső membránjához kötődik, és mélyhűtött/felolvasztott sperma vizsgálatára alkalmasabb, mivel a PSA a tojássárgájához nem specifikusan kötődik. Pena és mtsai (1999) egy új festési módszert fejlesztettek ki: a carboxy-SNARF-1, egy intracelluláris pH indikátor, amely az élő ondósejteket narancssárgára festi, kombinálható a FITC-PNA-val és a PI-dal.

Mivel a SYTO 17 festési mechanizmusa még nem teljesen tisztázott, és az élő, illetve elhalt sejtek jelzésére célszerű olyan festékeket használni, amelyek kötődési helye megegyezik (Garner és Johnson, 1995), célunk egy olyan festékkombináció kidolgozása volt, amely azonos sejtszervhez kötődve különbözteti meg az élő és elhalt sejteket és emellett az akroszóma állapotáról is információt ad.

Garner és mtsai (1994) egy egyszerű festékkombinációról számoltak be, amely segítségével az élő és elhalt sejtek aránya állapítható meg. Az élő sejteket a SYBR 14 festékkel jelölték, amely membrán-permeábilis, és a sejt DNS-éhez kötődve zölden fluoreszkál. Kontrasztfestékként PI-t alkalmaztak, amely a sérült membránon bejutva kötődik a DNS-hez, és intenzívebb vörös fluoreszcenciájának köszönhetően erősebb jelet ad, mint a SYBR 14. A festékkombináció segítségével három sejtpopuláció elkülöníthető: a zöld "élő" sejtek, a vörös "elhalt" sejtek, és azok, amelyek mind zöld, mind vörös fluoreszcenciát mutatnak, ezeket "haldoklónak" (moribund) nevezték – gyakorlatilag ez a szubpopuláció is elhaltnak tekinthető. A módszernek számos előnye van, gyors, egyszerű, mikroszkóppal is jól értékelhető, továbbá nem igényel UV megvilágítást. A festékek "LIVE/DEAD SPERM VIABILITY KIT" néven kereskedelmi forgalomban is hozzáférhetők. Ezek ismeretében egy olyan akroszómapróbát kerestünk, amely illeszthető a fent említett festékekhez. Graham és mtsai (1990) fikoeritrinnel (PE) konjugált PSA-t alkalmaztak, amely a FITC-PNA-val azonos módon kötődik az akroszómaéhoz, és a citométer második fluoreszcens detektorán észlelhető a narancssárga tartományban. Kísérleteinkben PE-PNA-t használtunk, a fent említett nem specifikus kötődés kivédése érdekében.



Vizsgálataink célja az új, SYBR14/PE-PNA/PI (SPP) kombináció precizitásának megállapítása, és a rutinszerűen alkalmazott FITC-PNA/PI módszerrel való összevetése volt.

## 5.2. ANYAG ÉS MÓDSZER

### 5.2.1. Spermaminták

Egy holland mesterséges termékenyítő állomáson termelő holstein-fríz tenyészbikák ondóját használtuk kísérleteinkben: rutin technológiával gyűjtött és TRIS-homogenizált tojássárgájás hígítóval 60 millió/ml sejtkoncentrációra hígított mélyhűtött bikaspermát vizsgáltunk. A műszalmákat 37°C-s vízfürdőben, egy percig olvasztottuk.

A citométeres vizsgálatokhoz a felolvasztott mintákat 5 ml-es Falcon csövekben 1:10 arányban hígítottuk CellWASH optimalizált PBS-oldatban (mindkettő: Becton Dickinson, San José, CA, USA. Katalógusszámok: 352054 és 349524).

### 5.2.2. FITC-PNA/PI festés

#### Festékoldatok

- FITC-PNA (L-7381, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA):  
1 mg/ml törzsoldat DMSO-ban (D-5879, Sigma Chemical Co.)  
Munkaoldat: 200 µg/ml (10 µl törzsoldat 40 µl PBS-ben hígítva).

- PI: LIVE/DEAD Sperm Viability Kit (L-7011, Molecular Probes, Eugene, OR, USA) B komponense, továbbhígítás nélkül.

### Festési eljárás

Egy ml hígított spermamintához 5  $\mu$ l PI-t és 5  $\mu$ l FITC-PNA-t adtunk. A végső lektinkoncentráció így 1  $\mu$ g/ ml volt (Flesch és mtsai, 1998). A mintákat keverés után 5 percig inkubáltuk sötétben 37°C-n. Citométeres analízis előtt a mintákat újra kevertük.

### 5.2.3. SPP festés

#### Festékoldatok

- SYBR 14: törzsoldat: LIVE/DEAD Sperm Viability Kit (L-7011, Molecular Probes) A komponense. Munkaoldat: továbbhígítva 1:10 arányban DMSO-val (Molecular Probes, online Fluorescent Handbook).
- PE-PNA: PHYCOPROBE PE-PNA (Cat. No. 44) 1 mg/ml oldat (Biomeda Corp., Foster City, CA, USA)
- PI: LIVE/DEAD Sperm Viability Kit (L-7011, Molecular Probes,) B komponense, továbbhígítás nélkül.

## Festési eljárás

Egy ml hígított spermamintához 1  $\mu$ l SYBR 14 munkaoldatot, 1  $\mu$ l PE-PNA-t és 5  $\mu$ l PI-t adtunk. A végső lektinkoncentráció így 1  $\mu$ g/ml volt (Flesch és mtsai, 1998). A mintákat keverés után 10 percig inkubáltuk sötétben 37°C-n. Citométeres analízis előtt a mintákat újra kevertük.

### 5.2.4. Flow citométer

Kísérleteinkben egy BD FACSCalibur flow citométert használtunk (Becton Dickinson), amely technikai paraméterei az alábbiak voltak:

Fényforrások:

- 15 mW, 488 nm léghűtött argon-ion lézer
- 5 mW, 635 nm vörös dióda lézer

Detektorok:

Morfológiai paraméterek:

- Sejtnagyság: FSC (forward scatter), fotodióda
- Granularitás: SSC (side scatter), 488/10 nm fotoelektron-sokszorozó (PMT)

Fluoreszcens paraméterek:

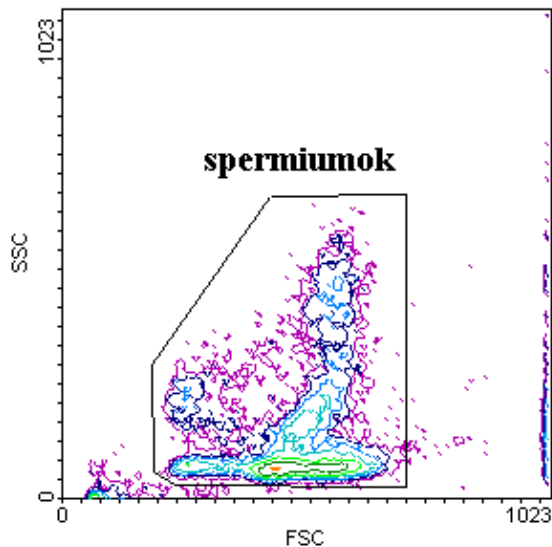
- FL 1: 530/30 nm PMT
- FL 2: 585/42 nm PMT
- FL 3: 670 LP nm PMT
- FL 4: 661/16 nm PMT

A berendezést naponta kalibráltuk CaliBRITE 3 kit (340486, Becton Dickinson) használatával, a FACSCComp 4.1 automatikus kalibráló program segítségével.

A citométert "LOW" áramlási sebességgel használtuk (12  $\mu\text{l}/\text{min}$ ).

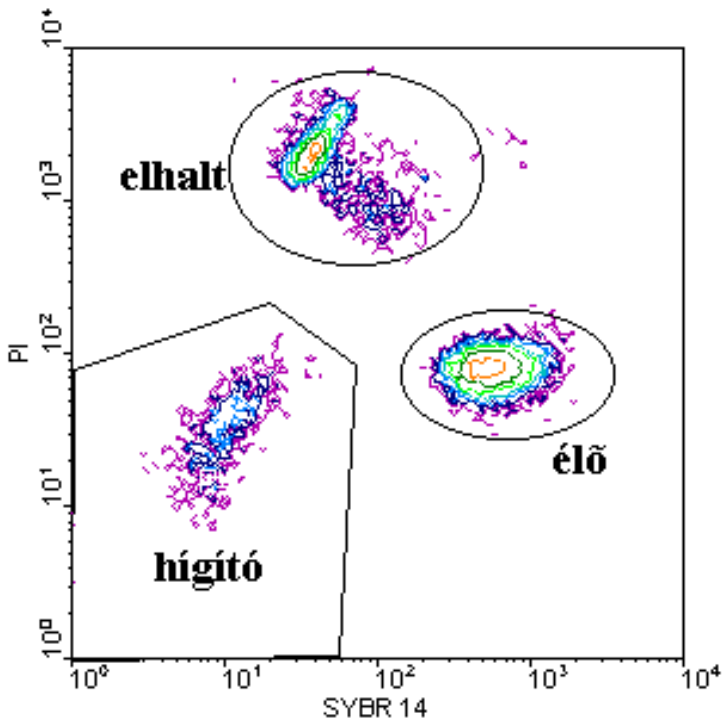
Az adatokat dot-plot citogramokként, a CellQuest 3.3 program (Becton Dickinson) segítségével elemeztük.

A "Spermium" (1. ábra) régiókat krioprotektív anyag hozzáadása nélkül folyékony nitrogén gőzében előlt, majd PI-dal festett friss spermaminták lefuttatásával határoztuk meg, a PI fluoreszcenciát mutató (DNS-tartalmú) sejtpopulációt visszavetítve az FSC/SSC citogramokra ("backgating").



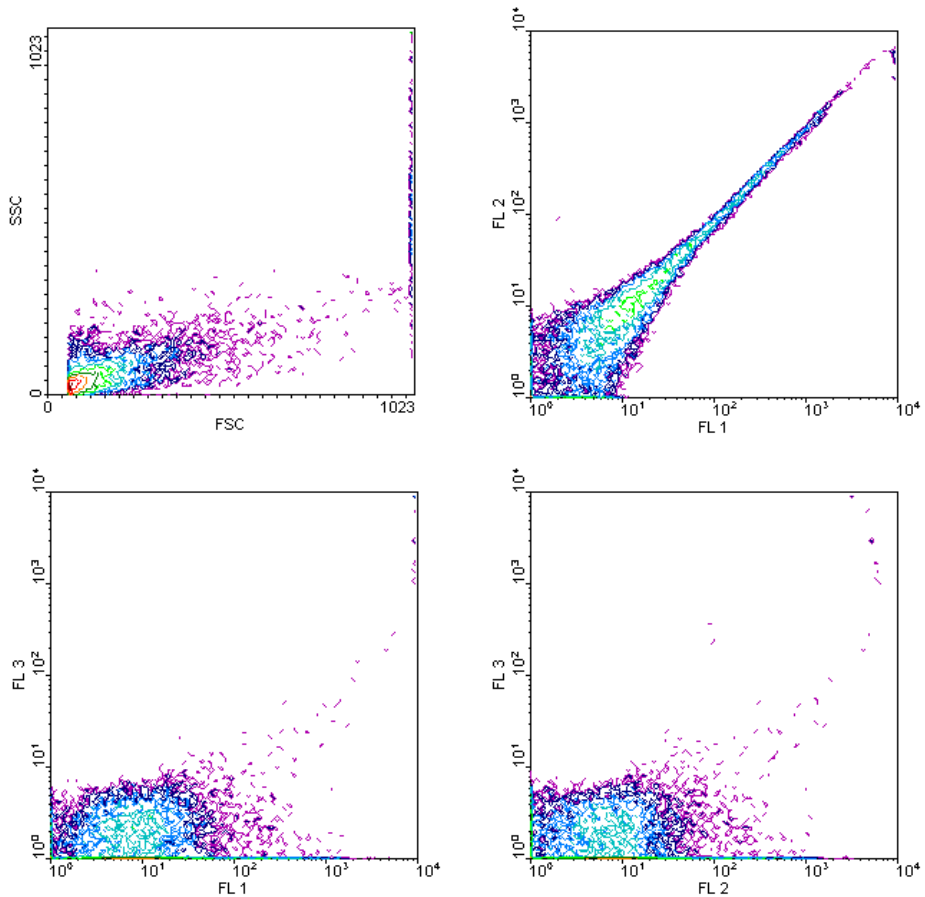
**1. ábra.** A spermiumpopuláció jellemző eloszlása szórófény-intenzitási citogramokon. FSC: sejtnagyság, SSC: belső granularitás. A fordított "L" alakú eloszlás a spermiumok aszimmetrikus alakjával magyarázható.

Az SPP-festett minták esetében, egy további, "hígító" régiót határoztunk meg a SYBR 14/PI citogramokon (2. ábra).



**2. ábra.** SYBR 14/PI- festett spermaminta. Az élő sejtek magas zöld (SYBR) fluoreszcenciát, az elhalt sejtek magas vörös (PI) fluoreszcenciát mutatnak. Az alacsony fluoreszcenciájú "hígító" populáció (tojássárgája-szemcsék, debris) tisztán elkülöníthető.

A hígító autofluoreszcenciájának és jellemző szóródási képének megismerésére, hozzákevert sperma nélküli hígítót is vizsgáltunk (3. ábra).

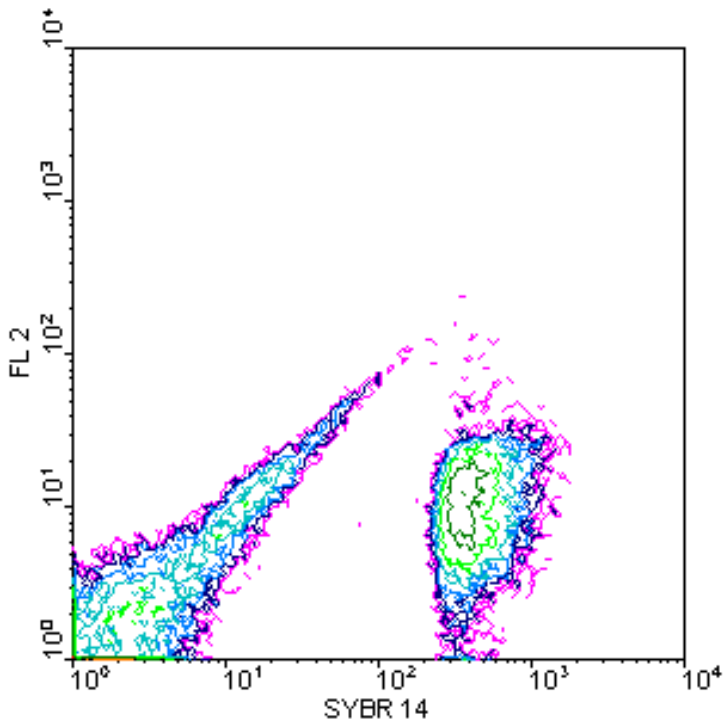


**3. ábra.** A TRIS-tojássárgája hígító jellemző szórtfény- és fluoreszcencia-intenzitásai.

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

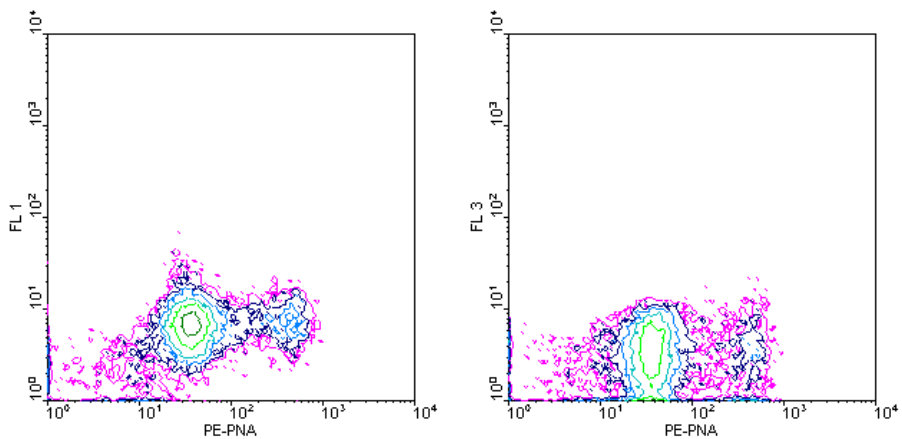
Az egyes fluoreszcens festékek más detektorokra való átszóródásának csökkentésére Roederer (1996) javaslatait követve elektromos kompenzációt végeztünk (4 - 6 ábrák).

A mintákat az esetleges nonspecifikus festődés kivédése érdekében kettős zöld/vörös szűrővel felszerelt Leica DM-LB epifluoreszcens mikroszkóppal ellenőriztük.



**4. ábra.** SYBR 14 (zöld fluoreszcencia, FL 1 detektoron észlelve) kompenzációja az FL 2 narancssárga fluoreszcens detektoron. SYBR 14-el festett spermaminta, 50% fagyasztással előlve.

A SYBR 14 membrán-permeábilis festékként festi az összes ondósejtet, így a kompenzáció beállításához negatív populációként a hígítót használtuk.

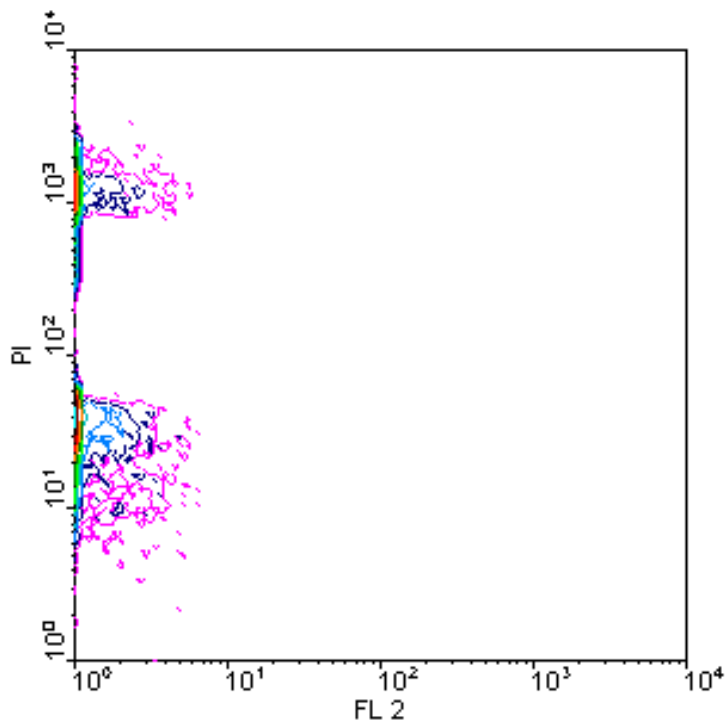


**5. ábra.** PE-PNA (narancs fluoreszcencia, FL 2 detektoron észlelve) kompenzációja az FL 1 zöld, és az FL 3 vörös fluoreszcens detektorokon.

PE-PNA-val festett spermaminta, 50% fagyasztással előlve.

A PE-PNA a külső akroszómamembránhoz kötődve, a reaktált/sérült akroszómát jelzi.





**6. ábra.** PI (vörös fluoreszcencia, FL 3 detektoron észelve) kompenzációja az FL 2 narancssárga fluoreszcens detektoron. PI-dal festett spermaminta, 50% fagyasztással előlve. A PI DNS-specifikus, membrán-impermeabilis festék, az elhalt ondósejteket jelzi.

### *5.2.5. A kísérletek menete*

#### 1. kísérlet

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.

#### 2. kísérlet

A tojássárgájának köszönhető mérési torzítás mértékének megállapítására az "élő, ép akroszómájú" spermium-szubpopulációban FITC-PNA/PI festés használata esetén, 14, véletlenszerűen kiválasztott, 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.

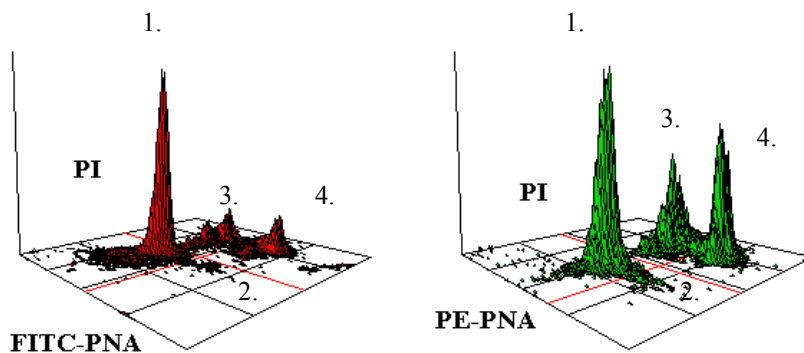
### *5.2.6. Statisztikai elemzés*

Az SPP módszer ismételhetőségét, illetve a két fluoreszcens festés közötti kapcsolatot Bland-Altman ismételhetőségi/módszer-egyetértési próba (method agreement analysis, Bland és Altman, 1986, Petrie és Watson, 1999) segítségével, a Microsoft Excel 97 programmal elemeztük.

### 5.3. EREDMÉNYEK

Mikroszkóp alatt a PE-PNA-val jelzett reaktált/sérült akroszómák narancssárga fluoreszcenciát mutattak, hasonló festődési mintával, mint a zölden fluoreszkáló, FITC-PNA-val festődött akroszómák.

Mind a FITC-PNA/PI, mind az SPP citogramokon négy - négy kvadránst különböztettük meg (7. ábra)



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

5. " élő sejtek ép akroszómával"
6. "élő sejtek sérült/reaktált akroszómával"
7. "elhalt sejtek ép akroszómával"
8. "elhalt sejtek sérült/reaktált akroszómával"

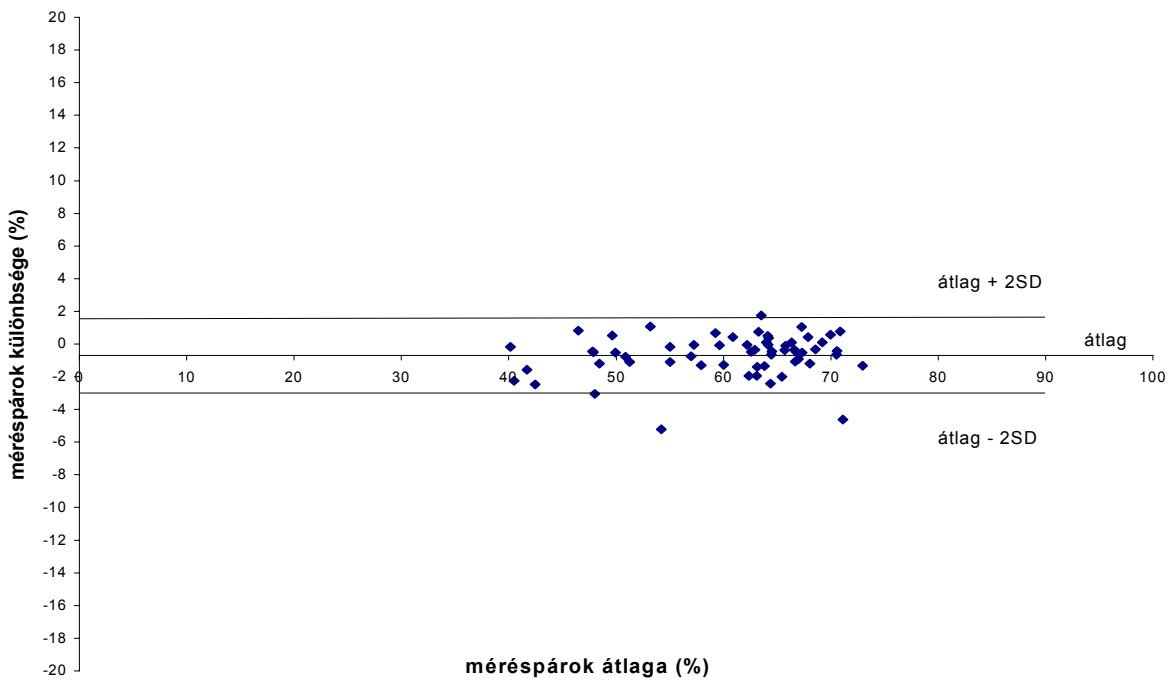
### *5.3.1. Az 1. kísérlet eredményei*

Az ismétlések közötti átlagos eltérés  $d=-0,7\%$ , a szórás  $SD= 1,3\%$ , a British Standard Institution ismételtetőségi index  $2SD=2,6\%$  volt, nagyfokú ismételtetőséget jelezve. Ahogy a 8. ábrán is látható, az egyes méréspárok különbségértékei egyenletesen szóródtak a  $d$  átlagos eltérés értéke körül, jelezve, hogy a méréspárok közötti különbség független a mért értékek nagyságától.

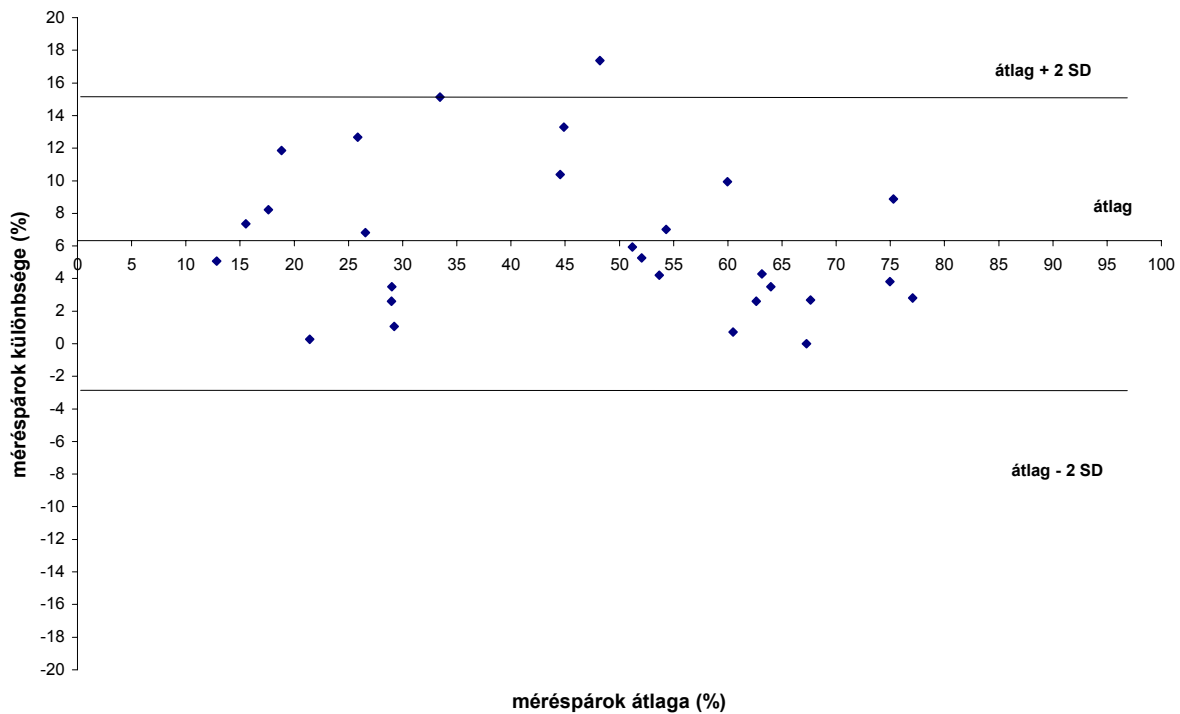
### *5.3.2. A 2. kísérlet eredményei*

Amint a 9. ábrán látható, az összes méréspár (0 óra és 3 óra) együttes értékelése azt mutatja, hogy – még a vizsgálat helyén használt homogenizált tojássárgája alkalmazásakor is – a FITC-PNA/PI festékkombinációval átlag  $6,3\%$ -al becsüljük túl az élő, ép akroszómájú spermiumok arányát (átlagos eltérés  $d = 6,33\%$ , szórás  $SD = 4,65\%$ ).

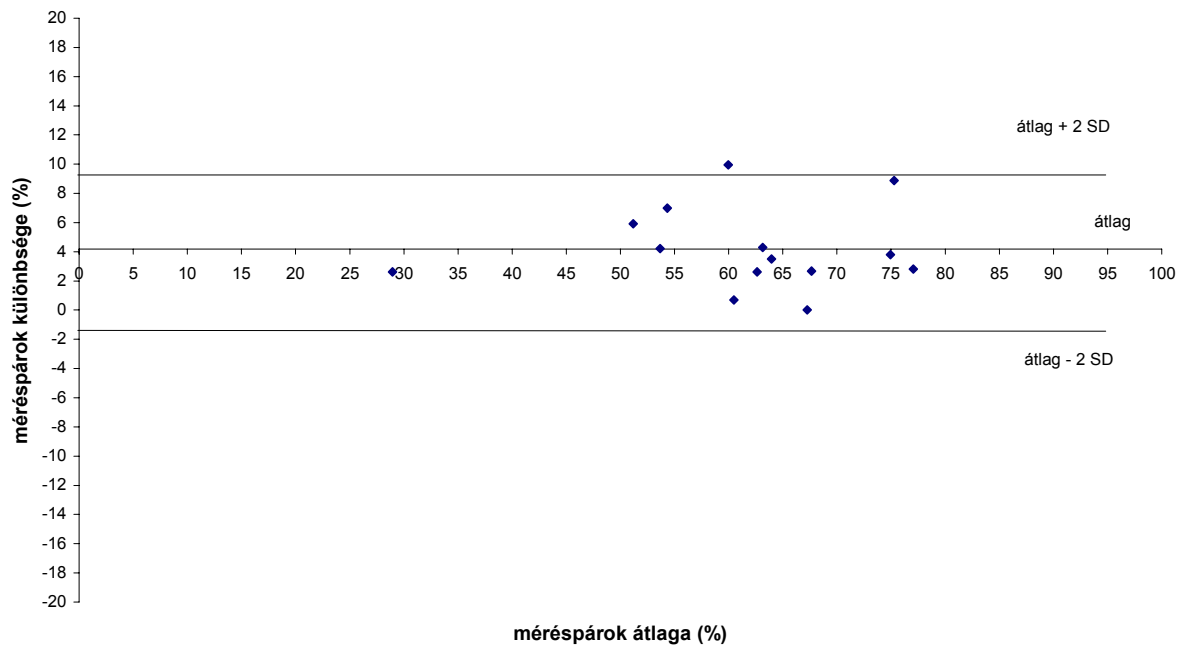
A 0, illetve 3 óra inkubáció után végzett mérések külön elemzésekor kitűnt, hogy a FITC-PNA/PI módszer torzítása nagyobb inkubáció után ( $d_{0\text{ óra}} = 4,21\%$ ,  $d_{3\text{ óra}} = 8,44\%$ , 10-11. ábra).



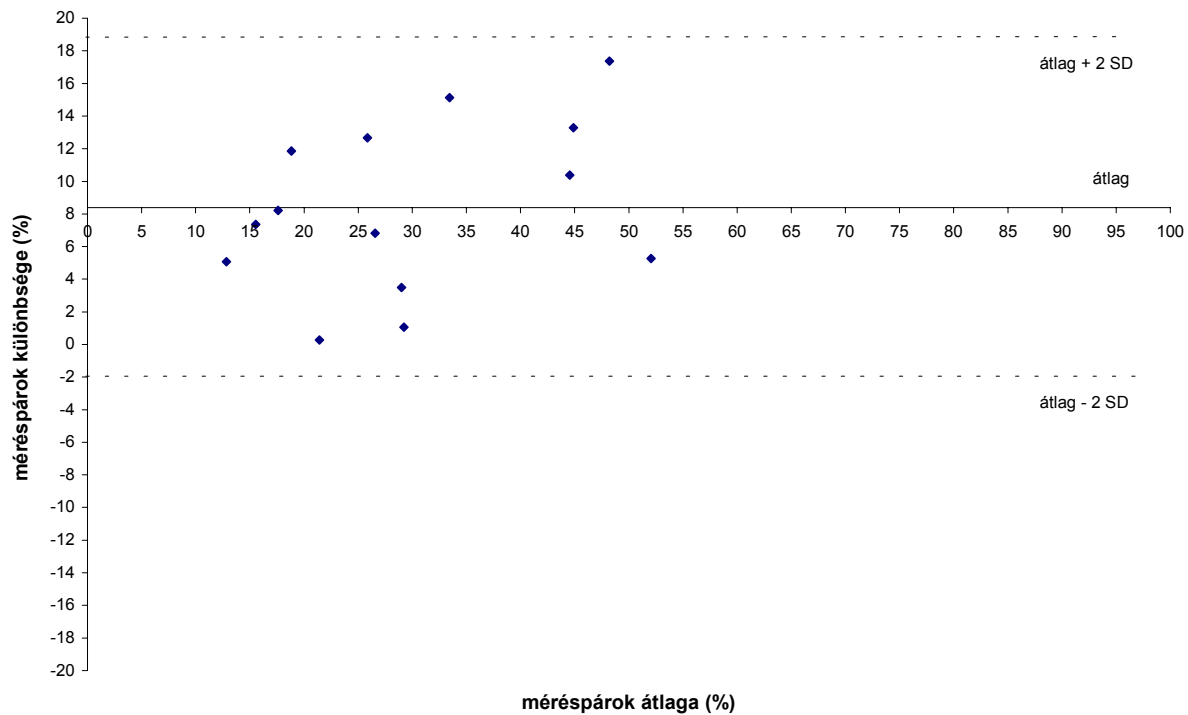
**8. ábra.** Az ismételt SPP mérés párok különbségei az átlaguk függvényében



**9. ábra.** FITC-PNA/PI – SPP méréspárok különbségei az átlaguk függvényében. Az összes méréspár (0 óra és 3 óra) együttes értékelése.



**10. ábra.** FITC-PNA/PI – SPP méréspárok különbségei az átlaguk függvényében. (0 óra).



11. ábra. FITC-PNA/PI – SPP mérés párok különbségei az átlaguk függvényében. (3 óra).



#### 5.4. KÖVETKEZTETÉSEK

A SYBR 14/PI DNS-specifikus festékpár alkalmazásával a tojássárgája-szemcsék és egyéb sejtörmelék világosan elkülöníthető volt a spermiumpopulációtól, így az SPP dotplot citogramokon jóval tisztább szubpopulációkat kaptunk, mint a FITC-PNA/PI citogramokon. Még homogenizált tojássárgája használata esetén is több, mint 6 % volt a FITC-módszer torzítása. Ez a túlbecslés nagyobb volt három óra inkubáció után. A jelenség azzal magyarázható, hogy az inkubáció során a spermiumok egy része elpusztult, míg a tojássárgája mennyisége változatlan maradt, így relatíve nagyobb arányú túlbecslést okozva.

Mikroszkóp alatt a PE-PNA-festett akroszómák a FITC-PNA-hoz hasonló festődési mintát mutattak, de PI-dal kontrasztfestve az elhalt, vörösen fluoreszkáló sejteken nehezen voltak elbírálhatók a narancssárga akroszómák. Célunk azonban nem egy újabb mikroszkópos festés, inkább egy direkt citométeres értékelési technika kidolgozása volt. A PE-és PI fluoreszcens jelek tisztán elkülöníthetőek voltak az FL 2 és FL 3 fluoreszcens detektorokon.

A PNA-hoz hasonló lektinek használatakor azonban egy speciális problémával kell szembesülnünk: azok a sejtek, amelyek teljesen elveszítették akroszómájukat, szintén az alacsony fluoreszcenciájú, "ép akroszómájú" szubpopulációban detektálódnak. Etanolos fixálás és plazma membrán permeabilizálást követően PSA-val jelölve, az ép akroszómájú spermiumok adnak pozitív fluoreszcens jelet (Miyazaki és mtsai, 1990, Szász és mtsai, 2000). Ez előnyös lehetne az ép akroszómájú és az akroszóma nélküli sejtek megkülönböztetésére, mivel ez utóbbiak az

alacsony fluoreszcenciájú, akroszóma-sérült szubpopulációban tűnének fel. Az etanollal fixált minták flow citométeres értékelése azonban nehézségekbe ütközik, mivel a fixálás sókiválást és agglutinációt okozhat (Crissman és Steinkamp, 1990, idézi Pena és mtsai, 1999).

Másik kérdéses pont az "elhalt, akroszóma-reaktált/sérült" szubpopulációba sorolt sejtek interpretációja. Ahogy az általánosan elfogadott, egy vitális és egy akroszómafesték kombinálása esetén, az elhalt sejtek reaktált akroszómával "fals" akroszómareakciót mutatnak. Azonban az akroszóma-reaktált, elhalt sejtek populációjában egyaránt található olyan spermiumok, amelyek a sejthalál folyamán veszítették el akroszómaintegritásukat (ez a degeneratív membránváltozás ténylegesen fals akroszómareakciónak tekinthető), illetve olyanok, amelyek az akroszómareakciót követően haltak el (így "igazi" akroszómareakció játszódott le), ahogy azt de Leeuw és mtsai (1991) és Way és mtsai (1995) megállapították. A probléma megoldása további kutatást igényel.

Összességében azonban megállapítható, hogy az általunk kidolgozott SYBR 14/PE-PNA/PI hármas festékkombináció flow citométerrel értékelve alkalmas az "élő, ép akroszómájú" spermiumpopuláció arányának becslésére, a módszer pontosabb a közismert FITC-PNA/PI kombinációnál, rendkívül precíz, és nem igényel olyan bonyolult mintaelőkészítési lépéseket, amelyek a rutinszerű alkalmazást megnehezítenék.

## 5.5. IRODALOM

1. Amann RP and Hammerstedt RH. In vitro evaluation of sperm quality: an opinion. *J Androl* 14:397-406 (1993).
2. Bland JM and Altman DG. Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement. *Lancet* i:307-310 (1986)
3. de Leeuw J, den Daas JHG and Woelders H. The fix-vital stain method; simultaneous determination of viability and acrosomal status of bovine spermatozoa. *J Androl* 12:112-118 (1991)
4. Flesch FM, Voorhout WF, Colenbrander B, van Golde LMG and Gadella BM. Use of lectins to characterize plasma membrane preparations from boar spermatozoa: a novel technique for monitoring membrane purity and quantity. *Biol Reprod* 59:1530-1539 (1998)
5. Garner DL, Johnson LA, Yue ST, Roth BL and Haugland RP. Dual DNA staining assessment of bovine sperm viability using SYBR 14 and propidium idoide. *J Androl* 15:620-629 (1994)
6. Garner DL and Johnson LA. Viability assessment of mammalian sperm using SYBR-14 and propidium iodide. *Biol Reprod* 53:276-284 (1995)
7. Graham JK, Kunze E and Hammerstedt RH. Analysis of sperm cell viability, acrosomal integrity and mitochondrial function using flow cytometry. *Biol Reprod* 43:55-64 (1990)
8. Hammerstedt RH. Evaluation of sperm quality: Identification of the subfertile male and courses of action. *Anim Reprod Sci* 42:77-87 (1996).

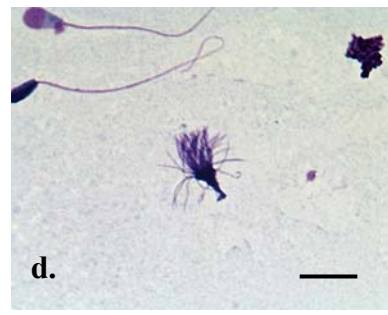
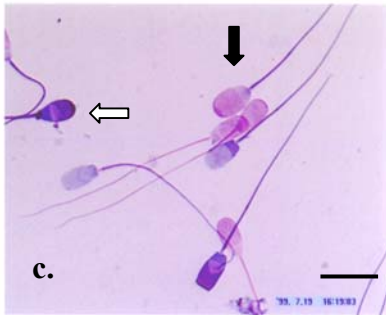
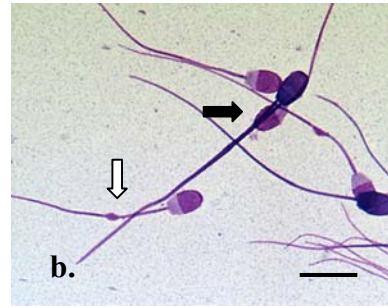
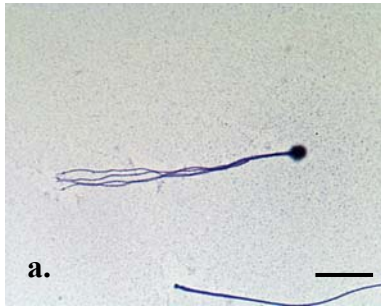
9. Miyazaki R, Fukuda M, Takeuchi H, Itoh S and Takada M. Flow cytometry to evaluate acrosome-reacted sperm. *Arch Androl* 25:243-251 (1990)
10. Molecular Probes online Handbook: <http://www.probes.com/handbook>
11. Parks JE. Applications of flow cytometry in semen processing and handling. *Proc 14<sup>th</sup> Tech Conf AI & Reproduction*. 12-17 (1992)
12. Pena AI, Quintela LA and Herradon PG. Flow cytometric assessment of acrosomal status and viability of dog spermatozoa. *Reprod Dom Anim* 34:495-502 (1999)
13. Pena A, Johannison A and Linde-Forsberg C. Post-thaw evaluation of dog spermatozoa using new triple fluorescent staining and flow cytometry. *Therio* 52:965-980 (1999)
14. Petrie A and Watson P. *Statistics for Veterinary and Animal Science*. Blackwell Science Ltd. 243 pages. (1999)
15. Roederer M. Compensation (An informal perspective) – <http://www.drmr.com/compensation> – latest modification: March 11, 1996.
16. Szász F, Sirivaidyapong S, Cheng FP, Voorhout WF, Marks A, Colenbrander B, Solti L and Gadella BM. Detection of calcium ionophore induced membrane changes in dog sperm as a simple method to predict the cryopreservability of dog semen. *Mol Reprod Dev* 55:289-298 (2000)
17. Thomas CA, Garner DL, DeJarnette JM and Marshall CE. Fluorometric assessments of acrosomal integrity and viability in cryopreserved bovine spermatozoa. *Biol Reprod* 56:991-998 (1997)

18. Way AL, Henault MA and Killian GJ. Comparison of four staining methods for evaluating acrosome status and viability of ejaculated and cauda epididymal spermatozoa. *Therio* 43:1301-1316 (1995)

## 6. FEJEZET

### KÖVETKEZTETÉSEK, JAVASLATOK

Ahogy Koehler is megállapítja (1985), a motilitásvizsgálati és vitális festési eredmények közötti eltérések magyarázatául szolgál a tény, miszerint az előbbi esetben a spermiumfajok funkcionális épségét, míg az utóbbi esetben a spermiumfej membránjának strukturális épségét értékeljük. Kísérleteinkkel bizonyítottuk, hogy azok az ondósejtek, amelyek feji része nem festődik (így "élőnek" szokás tekinteni), de farkuk igen, nem mozognak, így termékenyítésre sem képesek (2. fejezet). További vizsgálatainkban ezt a sejtkategóriát is "elhaltak" tekintettük. Egy-két százalékban találhatunk azonban olyan ondósejteket is, amelyeknek viszont a feji része festődött, a farka nem. Ezek a sejtek valószínűleg képesek mozogni, összhangban Garner (2000, személyes közlés) megfigyelésével, miszerint propidium-jodiddal festett mintákban is előfordulnak néha vörösen fluoreszkáló, mozgó spermiumok. Ezek a sejtek a sérült feji membránjuk miatt – feltételezhetően - nem képesek akroszómareakcióra, így termékenyítésre sem. Jelenlegi ismereteink szerint Kovács és Foote (1992) módszere az egyetlen festési eljárás, amellyel egyidejűleg vizsgálhatjuk a spermiumok feji és farki részének membránintegritását, az akroszóma épségét, továbbá a rendellenes alakú sejtek arányát is (1. ábra).



**1. ábra.** Spermiumdefektusok, egyéb sejtek különböző fajok ejakulátumaiban. Kovács –Foote festés. A vonal 10  $\mu\text{m}$ -t jelöl.

**1.a.:** Négyfarkú, degenerált fejű ondósejt (bikasperma).

**1.b.:** Fekete nyíl: kétfarkú ondósejt. Fehér nyíl: disztális citoplazmacsepp (kossperma).

**1.c.:** Fekete nyíl: Makrofejű ondósejt, "knobbed" akroszómadefektus. Fehér nyíl: körtefejű ondósejt (kansperma).

**1.d.:** "Medúza"-sejt (bikasperma).

Az említett festés valóban multiparaméteres értékelést tesz lehetővé, mindamelllett megfelel az Oettlé által 1986-ban az ideális spermafestésről leírtaknak: egyszerű, hiszen nem igényel drága berendezést. Megbízható: a 4. fejezetben leírt mintegy 10 %-os ismételhetségi koefficiens fénymikroszkópos vizsgálat esetén kifejezetten jónak tekinthető (igaz, ez

részben az értékelést végző személy rutinját is tükrözi). Nem változtatja meg a sejtek morfológiáját, a gyors fixálásnak köszönhetően a farok morfológiája és a citoplazmacseppek is értékelhetők ( a rossz fixálás biztos jele, ha a spermiumfarkak egy irányba állnak, mintha csak megfésülték volna őket!). Végül, hígított sperma vizsgálatára is alkalmas.

A módszer előnye a fluoreszcens próbával konjugált lektin akroszómafestékekkel szemben, hogy különbséget tesz az ép, illetve levált akroszómaúj spermiumok között.

A festést sikerrel alkalmaztuk más fajokon is (ló: Kovács és mtsai, 2000, nyúl: Nagy és mtsai, 1999, gím-és dámszarvas, Nagy és mtsai, 2001, jak: Nagy és mtsai, 2000, kecske: Molnár és mtsai, 2001). A sejt szerv-szintű vizsgálatok különösen jelentősek például ló spermamélyhűtési kísérleteknél: a generációk óta mélyhűthetőségre szelektált bikákkal ellentétben mének között nagy egyedi eltérések tapasztalhatók a fagyasztás/felolvasztás során bekövetkező spermaminőség-romlás jellegében (Domes, személyes közlés, 2000). Bikákra általában jellemző, hogy felolvasztás után az élő sejtek akroszómaja is ép, viszont átlag 10-15%-uk farokmembránja sérült. Sertés kanok spermiumainak akroszómaja tapasztalataink szerint kevésbé érzékeny: többnapos, 0% motilitású mintákban is gyakran számolunk 70-80% festetlen fejű, ép akroszómaúj ondósejteket, ezek jó részének farokmembránja azonban sérült volt. A kosok, mének spermiumai jóval érzékenyebbek, esetenként a vigyázatlan kenetkészítés (hideg festék, tárgylemez) műtermékeket, több elhalt sejtet eredményezhet. Kossperma folyékony eltartása során az élő sejtek egy része elveszíti akroszómaját (Sarhaddi és mtsai, 1995). A faji szintű, összehasonlító vizsgálatok folytatását feltétlenül érdemesnek tartom. A



háziállat-fajokon végzett szezonális-vizsgálatok (Sarlós és mtsai, 1996) például hasznos modellkísérletként szolgálhatnak egyes vad állatfajok szaporodásbiológiájának mélyebb megismerésére (Berger és Cunningham, 1994). A festési módszer továbbá hasznos lehet olyan szaporodásbiológiai alap kutatásokban is, mint például a spermaplazma termékenyülésre gyakorolt hatásának vizsgálatai (Brüssow és Rátky, 1992, Henault és Killian, 1996).

Bár a flow citométerek rutinszerű alkalmazása mesterséges termékenyítő állomásokon kissé utópisztikusnak tűnhet, véleményem szerint ez az a műszer, ami nagy precizitásával, gyorsaságával rövidesen megtalálja helyét a spermalaboratóriumokban. Tény, hogy a citométerek nem olcsók, és kezelésük képzett szakembert igényel. Azonban egy jobb fluoreszcens mikroszkóp árértékért már beszerezhető egyszerűbb, epiilluminációs típusok, és a beszerzés költségeit műszalmára vetítve már nem is tűnnek olyan drágának. Másfelől, hol alkalmazzunk képzett szakembert, ha nem egy spermalaborban? További kutatások szükségesek azonban az 5. fejezetben felvetett problémák megoldására: egyfelől egy olyan akroszómafesték alkalmazása, amely lehetővé teszi az ép akroszóma pozitív jelölését, így a sérült, reaktált akroszómájú, illetve akroszóma-nélküli sejtek egyaránt a negatív populációba kerülnének. Jelöltként szóba jöhető reagensek az acidofil Lysotracker (Molecular Probes, Eugene, OR, USA) festékek: Thomas és mtsai (1997) vizsgálatai szerint a Lysotracker Green-pozitív spermiumok (flow citométerrel értékelve) és a hagyományos, differenciál-interferencia-kontraszt mikroszkóppal ép akroszómájúnak minősített sejtek aránya között igen szoros,  $r = 0,97$  kapcsolat található. Problémát jelenthet viszont, hogy ezek a festékek nem specifikusan kötődnek az esetlegesen

előforduló citoplazmacseppekhez (saját, nem közölt észrevétel, 2000), illetve a spermahígítóban található tojássárgájához (Christensen, személyes közlés, 2000). Az elhalt sejtek esetében lejátszódott tényleges vagy fals akroszómareakció megkülönböztetésére pedig eltérő fluoreszcenciájú proakrozin-akrozin próbákat lenne érdemes kidolgozni (Asbóth, személyes közlés, 2001).

Mivel – legalábbis bikasperma esetén – a fagyasztás-felolvasztás során a spermiumfarok membránjának sérülései jelentősebbnek tűnnek, mint az akroszóma sérülései, a közeljövő fontos kutatási témája lehet egy olyan farokmembrán-specifikus fluoreszcens festési módszer kidolgozása, amely citométerrel is értékelhető, illetve kombinálható a dolgozat 5. fejezetében leírt fluoreszcens élő/elhalt+akroszómafestéssel. A kísérleteket a kereskedelmi forgalomban is elérhető tubulin-specifikus próbákkal lenne érdemes elkezdni. Első lépésként hasznosnak tartanám egy kifejezetten állattenyésztési/szaporodásbiológiai flow citométer-laboratórium felszerelését, ahol egyfelől a fentiekben körvonalazott kérdések megoldása lehetne kutatási cél, másfelől rutinvizsgálatok is végezhetők lennének a mesterséges termékenyítő állomások igényei szerint (például új technológia – hígító, mélyhűtő berendezés, stb – bevezetése esetén). A vizsgálatok természetesen kiterjeszthetők más állatfajokra is.

Végül, a gyakorlat számára is felhasználható tapasztalatként: a friss bikasperma feldolgozhatóságának eldöntésére – tekintve a faj nagyfokú szelektáltságát és az ugratási napok munkatempóját – a szubjektív, vizuális motilitásvizsgálat továbbra is megfelelőnek tekinthető. A feldolgozott, mélyhűtött, felolvasztott sperma (a forgalomba kerülő végtermék) minőségét azonban érdemes több szempontból is megvizsgálni. Ebben az

esetben megoldható több minta összegyűjtése és egyszerre történő vizsgálata. Multiparaméteres módszerrel szűrőpróbaszerűen végzett vizsgálatokkal ellenőrizhetőek a feldolgozási folyamat egyes lépései is, így meghatározhatók az adott technológia kritikus pontjai.

## IRODALOM

1. Berger J and Cunningham C. Bison. Mating and conservation in small populations. Columbia University Press, New York, USA. 330 pages (1994)
2. Brüssow KP and Rátky J. The duration of ovulation in GnRH-treated gilts following seminal plasma infusion. *Reprod Dom Anim* 28:119-122 (1992)
3. Henault MA and Killian GJ. Effect of homologous and heterologous seminal plasma on the fertilizing ability of ejaculated bull spermatozoa assessed by penetration of zona-free bovine oocytes. *J Reprod Fert* 108: 199-204 (1996)
4. Koehler JK. Mammalian sperm membranes: Their mosaic form and differential sensitivities. In: Johnson LA and Larsson K (eds.). *Deep freezing of boar semen*. Uppsala, Sweden, 1985, pp. 37-60.
5. Kovács A and Foote RH. Viability and acrosome staining of bull, boar and rabbit spermatozoa. *Biot Histoc* 67: 119-124 (1992)
6. Kovács A, Foote RH, Nagy Sz, Boersma A, Leidl W, Stolla R and Domes U. Live/dead and acrosome staining of stallion spermatozoa. 14<sup>th</sup> International Congress on Animal Reproduction, 2-6 July 2000, Stockholm, Sweden, p.82. (2000)
7. Molnár A, Sarlós P, Fáncsi G, Rátky J, Nagy Sz and Kovács A. A sperm tail defect associated with infertility in a goat – A case report. *Acta Vet Hung közlésre beadva* (2001)

8. Nagy Sz, Kovács A, Szász F, Merész L, Sinkovics Gy és Iváncsics J. A rutin spermavizsgálatok fejlesztési lehetőségei. *Állattenyésztés és Takarmányozás*, 48:660. (1999)
9. Nagy Sz, Qi X, Han J and Kovács A. Light microscopic investigations on frozen-thawed yak semen – a pilot study. Third International Congress on Yak (ICY), Lhasa, P.R. China, September 4-9. (2000)
10. Nagy Sz, Kovács A, Zubor T, Zomborszky Z, Tóth J and Horn P: Evaluation of frozen/thawed deer spermatozoa: short communication. *Acta Vet Hung* közlésre elfogadva (2001)
11. Oettlé EE. Using a new acrosome stain to evaluate sperm morphology. *Food Animal Practice* 263-266 (1986)
12. Sarhaddi F, Iváncsics J and Gergátz E. Effect of handling on viability and acrosome status of ram spermatozoa. *Acta Agronomica Óváriensis* 37:193-198 (1995)
13. Sarlós P, Molnár A, Huszár Sz, Rátky J and Brüssow KP. Seasonal changes of andrological characteristics in British milk ram. *Arch Tierz* 39:265-275 (1996)
14. Thomas CA, Garner DL, DeJarnette JM and Marshall CE. Fluorometric assessments of acrosomal integrity and viability in cryopreserved bovine spermatozoa. *Biol Reprod* 56:991-998 (1997)

## ÚJ KUTATÁSI EREDMÉNYEK

1. Igazoltam, hogy az ép feji membránú, festett farkú ondósejtek funkcionális szempontból nem tekinthetők élőnek (2. fejezet).
2. Elvégeztem a Kovács-Foote-féle spermafestési módszer műszeres (számítógépes motilitásvizsgáló berendezés, flow citométer) validálását. A festés elfogadható egyezést mutatott a citométeres értékeléssel, továbbá mikroszkópos vizsgálatokhoz képest jó ismételhetőségi értékeket kaptam (3-4. fejezet).
3. Kidolgoztam egy hígított sperma vizsgálatára is alkalmas új, gyors és egyszerű fluoreszcens, flow citométerrel értékelhető festési eljárást (5. fejezet).

## ÖSSZEFOGLALÁS

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 dolgozat első fejezetében a különböző spermabírálati eljárások kerültek ismertetésre, különös tekintettel a rutinszerű körülmények között alkalmazható módszerekre, azok fejlesztési lehetőségeire.

A második fejezet témája a Kovács-Foote féle vitális + akroszómafestés alkalmazhatóságának vizsgálata a spermiumok farokmembránjának értékelése szempontjából.

A harmadik fejezetben a farokfestődés és a számítógépes motilitás-értékelés közötti összefüggések vizsgálatai olvashatók.

A negyedik fejezetben az élő/elhalt+akroszómafestés flow citométeres összehasonlító értékelését mutatom be.

Az ötödik fejezet egy új, rutinszerűen alkalmazható flow citométeres festési eljárást ismertet, amely alkalmas tojássárgája-tartalmú hígítóban feldolgozott sperma-minták értékelésére.

A hatodik fejezetben a kísérleti eredmények összefoglaló értékelését végeztem el. Új kutatási eredményeimből kitűnik, hogy Kovács-Foote festési módszere alkalmas multiparaméteres spermaértékelésre, illeszthető

a rutin munkarendbe, segítségével az ondósejtek farki részének membránintegritása is értékelhető, továbbá megfelelő egyezést mutat az összehasonlító citométeres vizsgálatok eredményeivel.



## SUMMARY

Good sperm quality is essential for the success of artificial insemination. During routine analysis of sperm quality, concentration, percentage of motile spermatozoa and sperm morphology are the commonly investigated attributes. However, high correlations are rarely found between the results of these laboratory tests and field fertility. The complexity of fertilization requires the simultaneous evaluation of several spermatozoan attributes.

In Chapter 1 several methods of semen quality assessment are discussed. Emphasis is added on the routine applications of these tests and the possibilities of their improvements.

In Chapter 2 the use of the live/dead and acrosome staining of Kovács and Foote for studying the plasma membrane integrity of the sperm tail is discussed.

In Chapter 3 sperm tail staining results are compared to the results of the computer-assisted semen analysis.

In Chapter 4 the results of the method agreement analysis between the above-mentioned staining procedure and flow cytometric studies are presented.

In Chapter 5 a new, flow cytometric live/dead + acrosome staining combination is introduced for routine analysis of semen processed in egg yolk-based extenders.

In Chapter 6 general discussion is taken. As my results suggest, the staining method of Kovács and Foote is suitable for multiparametric sperm analyses, it can be adjusted to the routine work of a semen laboratory,

moreover a good agreement was found between the staining and the flow cytometric analyses.

## KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek, Iváncsics Jánosnak és az Állattenyésztési Intézet munkatársainak, amiért a dolgozatomban foglalt kutatások elvégzését számomra lehetővé tették.

Köszönetet szeretnék mondani mindazoknak, akikkel együtt dolgozhattam az elmúlt évek során:

Gábor György, Molnár András, Sarlós Péter, Rátky József – Állattenyésztési és Takarmányozási Kutatóintézet, Herceghalom.

Merész Lajos, Pécsi Tamás, Szász Ferenc, Tóbiás Sándor, Várszegi József – Országos Mesterséges Termékenyítő Rt., Gödöllő.

Baranyai Bence, Bodó Szilárd, Gócza Elen – Mezőgazdasági Biotechnológiai Központ, Gödöllő.

Sinkovics György – Tessedik Sámuel Főiskola, Szarvas.

Révay Tamás – Budapesti Műszaki Egyetem.

Bognár Miklós inszeminátor, Veszprém.

Fáncsi Gábor.

Házás Gábor.

Auke Boersma, Ursula Domes, Werner Leidl és Rudolf Stolla – Ludwig-Maximilian Egyetem, München, Bajorország.

Bert Sleumer, Einko Topper, Ronald Van Giessen ( és az összes jóbarát az ALTA-nál!) – ALTA Europe, Hollandia.

Don Evenson, Lorna Jost – South Dakota Állami Egyetem, Brookings, USA.

Robert Foote – Cornell Egyetem, Ithaca, USA.

Han Jianlin és Qi Xuebin – Gansu Agrártudományi Egyetem, Lanzhou,  
Kína

Pongi & Somfa.

Külön köszönetem Kovács Andrásnak – ÁTK, Herceghalom, akivel nemcsak a spermáról beszélgettünk (beszélgetünk!), de a *Testudo graeca*-tól a kouprey-n át a dhole-ig mindenről!

Köszönettel tartozom Szüleimnek a folyamatos erkölcsi és anyagi támogatásért!

Lepossa Anitának, Niának sok-sok köszönet – nemcsak a digitális fotókért és a jó mikroszkópért!