

Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem
Georgikon Campus
Növénytermesztési-tudományok Intézet
Mezőgazdasági mérnök alapképzési
szak

MESTERSÉGES TERMÉKENYÍTÉSRE HASZNÁLT
BIKASPERMA MORFOMETRIAI ÉRTÉKELÉSE
Szakdolgozat

Belső konzulens: Dr. Nagy Szabolcs Tamás
egyetemi tanár

Belső konzulens intézete, tanszéke:
Állattenyésztési Tudományok Intézet, Precíziós
Állattenyésztési és Állattenyésztési Biotechnika Tanszék

Készítette: Major Emma

Készthely

2023

Tartalomjegyzék

1. Bevezetés.....	3
2. Irodalmi áttekintés	5
2.1. A mesterséges termékenyítés jelentősége.....	5
2.2. Spermatermelés a mesterséges termékenyítéshez.....	8
2.3. Spermatogenezis és spermiogenezis	9
2.4. A mesterséges termékenyítéshez használt sperma minőségellenőrzése	12
2.5. Spermiummorfológia jelentősége, vizsgálati lehetőségei.....	15
2.6. Spermaminőség és a fertilitás kapcsolata	18
3. Anyag és módszer	23
3.1 Feulgen festés.....	23
3.2. Fotók analizálása.....	25
3.3. Statisztikai elemzés	27
4. Eredmények	28
5. Következtetések	32
6. Összefoglalás	33
Irodalomjegyzék:	35
Köszönetnyilvánítás	37
NYILATKOZAT a szakdolgozat nyilvános hozzáféréséről és eredetiségéről	38

1. Bevezetés

Az Egyesült Nemzetek Szervezete becslése szerint a Föld lakossága elérte a 8 milliárd főt 2022. november 15-én. Ekkora méretű embertömeget kizárólag a legmodernebb és –hatékonyabb mezőgazdasági technológiákkal és módszerekkel lehet élelmezni, ezek közül emelkedik ki a biotechnológia. Mind a növénytermesztés, mind az állattenyésztés területén jelentős szerepe van és előreláthatólag ez a szerep a jövőben csak növekedni fog. Az állattenyésztési gyakorlatban legelterjedtebb technológia a mesterséges termékenyítés, mely felfedezése óta gyökeresen átalakította az ágazatot.

Elnézve egy modern mesterséges termékenyítést, azt gondolhatnánk, hogy ez egy viszonylag fiatal kutatási terület, valójában azonban az első történetek emberi segítséggel történő spermaátvitelről már XIII. századi arab iratokban megtalálhatóak. Tudományosan megalapozott kutatása viszont a XVII. században kezdődött, amikor a németalföldi van Leeuwenhoek 1677-ben felfedezte és leírta a spermiumot saját maga által készített mikroszkópja segítségével. Az első sikeresen elvégzett inszeminációig várni kellett több mint 100 évet, ameddig 1779-ben Lazaro Spallanzani kísérletével bizonyította, hogy az ivarzó nőtény méhébe juttatott ondóval fogamzást lehet elérni, és a szabályos vemhességi idő, 62 nap leteltével meg is születtek a kiskutyák a kísérletben részt vevő szukától. Emellett ő volt az első, aki leírta a hő hatását a spermiumok mozgásképessegeire, miután csödör spermáját 30 percig hóban tárolta és azt tapasztalta, hogy a sejtek elvesztik motilitásukat, majd felengedésük után visszanyerik azt (GORDON, 2004).

Nagy név a mesterséges termékenyítés kidolgozásának kapcsán Ilja Ivanovics Ivanové, aki a XIX. és XX. század fordulóján élt és dolgozott Oroszországban, ami munkássága révén a terület szellemi központjává vált. Számos laboratóriumot hozott létre és több állatfajjal is végzett vizsgálatokat, tanulmányozta a haszonállatok ivarszerveit és működésüket, a termékenyülés folyamatát, és eredményeket ért el spermakonzerválás területén is. Kidolgozta a spermiumok kinyerésének, tárolásának és szállításának módját, illetve a mesterséges beondozás technikáját. Neki köszönhető a világ első mesterséges termékenyítő központja is 1901-ben és a technológia elterjedéséhez is jelentősen hozzájárult publikációi által (PÉCSI, 2007).

Mindezidáig kezdetleges módszerekkel, szivacsban fogták fel a spermát, így nagy áttörést jelentett az első műhüvelyek megjelenése, 1914-ben Amantea hozott létre ilyen eszközt kutyák számára. Gazdasági állatok, vagyis szarvasmarha, ló és juh részére pedig Milovanov, Ivanov utódja fejlesztett ki műhüvelyeket. Ezen eszközök segítségével tisztán tudták felfogni az ejakulátumot és lehetőség nyílt tulajdonságainak tüzetesebb megvizsgálására, hígítása és a spermadozírozás kidolgozására, ami szintén Milovanov érdeme (GERE et al., 1998).

A dán Sörensen és munkatársai kifejlesztették a ma is használatos rektovaginális termékenyítési technikát szarvasmarhában, emellett az ő nevéhez fűzhető a műszalma feltalálása is 1940-ben, amit később a francia Cassou továbbfejlesztett és elkezdte világszerte forgalmazni. Innentől kezdve terjedt el a műanyag katéterek alkalmazása a mesterséges termékenyítésben (PÉCSI, 2007).

Az 1950-es években tovább fejlődött a tudományág, a kutatók többek között az eltarthatóság javítására összpontosítottak, ezen területen hoztak áttörést Polge és Rowson

kísérletei, ők voltak az elsők ugyanis, akik sikeresen végezték el bikasperma mélyhűtését 1950-ben. Ettől kezdve terjedt el a mai napig érvényes gyakorlat, miszerint a termékenyítő adagokat műanyag műszalmában folyékony nitrogénben $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on tárolják szarvasmarha esetében. Ez új távlatokat nyitott meg a mesterséges termékenyítésben, lehetővé téve a spermaszállítást és a hosszútávú megőrzését is (GERE et al., 1998).

Hazánkban a mesterséges termékenyítésről az első források a XX. század elejére tehetőek, a technika azonban a II. világháborút követően került be a gyakorlatba, mivel a súlyosan károsodott állatállomány szaporítására gyors és minőségi javulást elérő módszer kellett. Először a lótenyésztésben alkalmazták, már a két világháború között kísérletezett vele eredményesen Treisz János, majd Marossfy Lajos. Szarvasmarhában hamar elterjedt, az 1950-es években már kiépített termékenyítőhálózat működött az országban. A hazai bevezetésében a mesterséges termékenyülésnek, illetve az elterjesztésében és az országos hálózat kiépítésében elvülhetetlen érdemeket szerzett Mészáros István professzor, aki munkásságáért 1963-ban Kossuth-díjat kapott (GERE et al., 1998).

A mesterséges termékenyítés elképesztő mértékben fejlődött az elmúlt 60 évben, és ez a folyamat folytatódik napjainkban is a technika szárnyalásával, amikor olyan eszközök állnak rendelkezésünkre, mint a mesterséges intelligencia. A jelenlegi kutatások is az új technológiák kiaknázására és a reprodukív folyamatok mélyebb megértésére irányulnak. Ennek ellenére még számos terület vár fejlesztésre a mesterséges termékenyítésben, ideértve például spermavizsgálati módszereket, sperma szelekciós technikákat, a spermaszexálás területét, vagy az eltarthatóság hatékonyságára irányuló kutatásokat. Emellett a gazdasági állatok különböző fajainak körében is előreláthatólag növekedni fog a mesterséges termékenyítés használata, úgy, mint a húshasznú szarvasmarhatartás, lótenyésztés vagy a kiskérődzők körében (ZUIDEMA et al., 2021).

A spermaértékelési vizsgálatok során gyakran alkalmazzák a spermiummorfológiát a hibás sejtek arányának megállapítására. A módszer egyszerű és olcsó, azonban lassú, nem reprodukálható és nagyban befolyásolja a vizsgáló szubjektivitása. A tudomány és a piac részéről is régóta igény van a gyors, műszeres és objektív vizsgálati módszerekre. Erre nyújthat megoldást a spermium morfometria, amely során általában a spermiumfej paramétereit mérik, úgy, mint a területe, kerülete, hossza és szélessége, mivel ezekből az alap adatokból számos egyéb adat kiszámolható. A morfometria értékelhető hagyományos fénymikroszkópos vizsgálattal, digitális képelemző szoftverrel vagy automatizált sejtanalízissel. A mérésekhez szükséges a sejtek megfestése, pl. Feulgen-féle festéssel. A morfometria és morfológia területe szorosan összefügg egymással, ami nem meglepő, végiggondolva, hogy morfológiai abnormalitások között is számos olyat találunk, ami a feji részt érinti. A spermiumfej megváltozott alakja a normális értéktartományoktól eltérő adatokat eredményez, így elkülöníthetők a hibás és ép felépítésű spermiumcsoportok, így szelekciós alapul szolgálhatnak az ilyen mérések. A módszer hátránya, hogy az automatizált mérés nem képes azonosítani a spermiumdefektusokat, ezek felismerésére fejlettebb és drágább szoftver szükséges (BOLLWEIN-MALAMA, 2023)

2. Irodalmi áttekintés

2.1. A mesterséges termékenyítés jelentősége

Az állattenyésztésben az elsődleges gazdasági hasznát az ivadékok jelentik, ezért elengedhetetlen, hogy a szaporodásbiológia megfelelően működjön, és minél több utód jöjjön a világra. A mesterséges termékenyítés ezen a területen jelentett léptékváltást, ugyanis lényegesen hatékonyabb és gyorsabban el lehet vele érni szelekciós célkitűzéseket, mint természetes pároztatással. Az eljárás során a hím állat ondósejtjeit műhüvelyben felfogják, ezután laboratóriumban vizsgálják a sejtek életképességét, majd különböző spermahígítók hozzáadásával hígítják, szétosztják termékenyítőadagokra és hűtve tárolják. Hosszabb ideig tartó tárolás esetén mélyhűtéssel tartósítják és felolvasztás után inszeminálják vele a nőtény állatot (GERE et al., 1998).

A módszer számos előnnyel bír a természetes pároztatással szemben. Természetes körülmények között egy ejakulátum 4-5 milliárd spermiumot tartalmaz és ezzel egy tehenet termékenyít meg a bika, így sikeres fogamzás és vemhesség eredményeként ált. egy utód jön világra. Ezzel szemben mesterséges termékenyítéskor a hígítás során lecsökkentik a termékenyítőadagonkénti spermiumok számát, a megtermékenyüléshez ugyanis elegendő néhány száz ondósejt is, így több termékenyítőanyag nyerhető ki egy ejakulátumból. Így lehetséges az, hogy a természetes pároztatás során elérhető évi 70-80 utód helyett az évi több ezer utódszám is teljesíthető (ZUIDEMA et al., 2021).

Ugyanennek a nagyszámú elérhető szaporulatnak köszönhető, hogy kevesebb apaállat szükséges, ezáltal megszűnik a hím tartási költsége. Mivel kevesebb apaállat vesz részt a szaporításban, nő a szelekciós nyomás, hamarabb el lehet érni a kitűzött szelekciós célt és egységesíteni az állományt. A sok utód lehetőséget nyújt a tenyészbikák tenyészértékének korábbi megbecsülésére a széleskörű és rövidebb ideig tartó ivadékvizsgálat révén. Azonban az előnyök mellett oda kell figyelni a lehetséges hátrányokra is, névlegesen például egyes hímek túlzott favorizálása következtében felmerülő beltenyésztésre. Nagy felelősséggel jár a spermiumok és bikák ellenőrzése is, ugyanis ugyanolyan gyorsasággal és széles körben tudnak elterjedni a rejtett genetikai terheltségek és nem kívánatos küllemi hibák is, mint a javítani kívánt tulajdonságok. A jelenség fokozott fontossággal bír a nemzetközi spermakereskedelemben részt vevő hímek esetén (PÉCSI, 2007).

A mesterséges termékenyítésben részt vevő hímek és spermájuk alapos és rendszeres vizsgálatnak vannak alávetve, így az állat egészségi állapota is monitorozva van, emellett a párzás útján terjedő betegségeknek, mint például a brucellózis, a lovak tenyészbenasága, stb. is gátat vet. Kevésbé is veszi igénybe az apaállat szervezetét az eljárás, mint a természetes fedezés, ezért a nagyértékű hímek igény esetén hosszabb ideig is tenyésztésben tarthatók. Szervezeti problémák esetén, mint a lábfájás vagy a bikák elnehezedeése, sincsenek annyira akadályozva a párzásban, ezért nem kizáró okok (GERE et al., 1998).

Nem csak a termékenyítések jelentős számával képes a szaporítás hatékonyságát növelni, hanem a termékenyítések sikerességével is, szakszerűen elvégzett mesterséges termékenyítés során emelkedhet a fogamzási százalék. Ugyanis az ellenőrzött, tehát nagy valószínűséggel termékeny spermát szarvasmarhánál egyenesen a méhnyak-csatornába

juttatják, így nagyobb az esély a megtermékenyítésre. A rendszeres emberi kezelésnek megvan az az előnye is, hogy a beteg tehenek is kiszűrésre kerülnek, ahogy a spermavizsgálat során a nem megfelelően termékenyítő apaállatok. Hátránya viszont, hogy a természetesen nehezen fogamzó anyák is nagyobb eséllyel vemhesülnek, és a hajlam öröklődik, ami hosszú távon nem kedvező tényező az állományban (GERE et al., 1998).

A hozzáértő üzemeltetése az emberi beavatkozással zajló párosításnak pénz-, idő- és szakértelemigényes. Megfelelően képzett szakember szükséges a spermavételhez és az inszeminálás véghezviteléhez, illetve kiemelt fontosságot kap az ivarzás detektálása, amire ugyan manapság számos precíziós eszköz áll segítségül, ám ezek használata mellett is elengedhetetlen a gondos humán munkaerő és odafigyelés, ugyanis az ivarzás elszalasztása igen nagymértékű károkat és bevétel kiesést okozhat. Szintén tapasztalatot követel meg a csendesen ivarzó állatok kiszűrése. A sperma bevizsgálása laboratóriumi eszközöket igényel, ami tovább növeli az eljárás költségét. Kiemelten fontos az örökítőanyag megfelelő tárolása, elégtelen hűtés, a sperma szakszerűtlen kezelése vagy a higiénia hiánya is okozhat jelentős anyagi veszteségeket. A másik nagy szakértelmet igénylő terület a tenyésztésszervezés, szem előtt kell tartani a tenyészcélokat, a párosítani kívánt egyedek genetikai hátterét, felmenőit, a lehetséges rokontenyésztés elkerülése érdekében (GERE et al. 1998).

A spermamélyhűtés és szállítás kifejlesztésével a tenyésztésszervezés számára olyan távlatok nyíltak, amire előtte még nem volt példa. A tenyésztők immár nincsenek földrajzi keretek közé szorítva, a világ bármely tájáról beszerezhetik az örökítőanyagot, amely a számukra kívánatos kiváló genetikával rendelkezik, kedvükre válogathatnak a fajtából, típusból, vonalból. Nem csak a tér, az idő is jelentős tényező, ami korlátozó hatását csökkenti a mélyfagyasztás, ugyanis így eltárolható hónapokra az örökítőanyag és igény szerint felhasználható. Nem minden faj spermájának lefagyasztása megoldott vagy bevett szokás, így pl. a sertésé vagy a juhé, ezen fajok spermájánál a hűtve tárolás az elterjedt, szarvasmarha esetében azonban a mélyhűtés a standard gyakorlat az egész világon. A spermaszállítás másik nagy előnye, hogy ezzel elkerülhető a körülményes és kockázatos élőállatszállítás, nem kell az értékes tenyészállatokat a szállítás és az új környezet okozta stressznek kitenni, illetve akklimatizációs és karantén idővel számolni (ZUIDEMA et al., 2021).

A mesterséges termékenyítés az egész világon elterjedt, számtalan állatfaj, köztük az összes gazdasági állat körében alkalmazható, azonban a mérték nagyban eltér egyes fajok között. A technikák és eszközök alkalmazkodtak a fajok szervezeti sajátosságaihoz és a sperma frissen vagy fagyasztva-felengedve történő felhasználásában és a spermiumok ellenállóképességében is találunk különbségeket, így például sertésben szinte kizárólag frissen használják fel a spermát, szarvasmarhában pedig épp ellenkezőleg, szinte csak fagyasztva. A tejelő szarvasmarha ágazatban Európában, Izraelben, Japánban és Új-Zélandon a termékenyítések 80-90%-a mesterséges termékenyítéssel történik, míg ez az arány az USA-ban 2019-ben 60% volt. Ezzel szemben fejlődő országokban tejelő ágazatban is inkább természetes pároztatást alkalmaznak, ahogyan világszerte a hústípusú állományokban is, mivel ott nagyobb hangsúlyt kap a legeltetés, ezért praktikus okokból bikát tartanak a fedeztetésre. A szarvasmarha különleges helyzetben van a többi gazdasági állattal szemben, ugyanis erre az állatfajra dolgozták ki a technológiát először ipari mértékben. Megmutatkozik ez abban is, hogy napjainkban a mesterséges termékenyítés piacának közel 50%-át a tejelő szarvasmarha teszi ki, így a kutatások és fejlesztések is

elsősorban erre a területre irányulnak. Vannak különleges helyzetben lévő ágazatok, pl. a pulykahízlás, ahol 100%-ban mesterséges termékenyítést alkalmaznak (ZUIDEMA et al., 2021).

2.2. Spermatermelés a mesterséges termékenyítéshez

A spermavétel az egyik legkritikusabb lépése a mesterséges termékenyítés folyamatának. A megfelelő higiénia, technika és eszközök elengedhetetlenek a jó minőségű és elegendő mennyiségű örökítőanyag gyűjtéséhez. A technika állatfajonként változik, azonban a legáltalánosabb elterjedt a faj sajátosságainak megfelelően kialakított műhüvellyel történő gyűjtés, ritkább esetben fordul elő az elektroejakulációs módszer (PÉCSI, 2007).

A műhüvelyhez való szoktatás időt és türelmet igényel, de a tanulási időszak után a legtöbb hím gond nélkül tudja használni az eszközt, csupán 5-15%-uk utasítja vissza. Kétféle csoportja létezik a modelleknek, a nyitott végű, amely lehetővé teszi a fragmentált ejakulátum gyűjtését, illetve a zárt végű modellek. Noha a fajok sajátosságaihoz vannak igazítva, a felépítésük általánosságban mégis megegyezik a műhüvelyeknek. Elmondható, hogy mindegyik egy merevebb külső és egy rugalmasabb belső részből áll, ez utóbbi anyaga általában gumi. A hüvelykülső- és belső közötti üreges részt meleg vízzel, esetleg levegővel töltik fel, hogy ideális, a természetes hüvelyjel megegyező hőmérsékletet biztosítsanak a bikának a lemagzáshoz és a spermiumok életben maradásához. Az ejakulációs reflex kialakulásához a mesterséges hüvely hőmérsékletét 41-42 °C-ra kell beállítani, ennél alacsonyabb hőmérsékleten az ejakuláció nem biztosított, magasabb hőmérsékleten pedig a spermiumok életképessége csökken. Nem csak a hőnek kell optimálisnak lennie, a megfelelő nedvességet valamilyen síkosítóval, pl. spermahígítóval, a nyomást pedig a szeleppel ellátott műhüvelyekben levegővel, a szelep nélküliekben vízzel érik el (HARASZTI-ZÖLDÁG, 1993).

Az ily módon kialakított műhüvelyek végére kerül a spermagyűjtésre szolgáló edény, ami lehet spermavételi pohár, vagy spermacső. A pohár lehet egyszeres vagy duplafalú és megfelelő kialakítással lehet a mesterséges hüvelyhez rögzíteni, a dupla falak közé meleg vizet töltenek, ez hivatott a spermiumokat megvédeni a hirtelen lehűléstől. A spermafogó csövecskét általában szilikonból készült tölcser segítségével kapcsolják össze a hüvellyel (PÉCSI, 2007).

Az ugratáshoz fedezőpartnerként használhatnak ivarzó nőtényt, azonban mesterséges termékenyítőállomásokon az ilyen állatok tartása tilos, illetve higiéniai és balesetvédelmi szempontból az élő állat használata mindig kockázatos. Viszont nagy szolgálatot tehetnek ivarzó nőtények a fantomhoz szoktatás időszakában, illetve természetes fedezéshez szokott apaállatok spermavételénél, esetleg olyan telepen, ahol helyben használják fel a termelt ondót, pl. juhászatokban (PÉCSI, 2007).

A másik gyakran alkalmazott módszer, a másik apaállat, mint fedezőpartner, ugyanis bikáknál és ménéknél kulcsingerként elegendő az ivarzó nőtény hátsó körvonalára hajazó látvány, ezt az ingert kielégítheti egy másik, hím vagy fantom is. A másik bika alkalmazásánál fontos, hogy kezelhető, nyugodt állat legyen és a mérete nagyságrendileg megegyezzen a fedező bikáéval. Ilyen eljárás során a partnert kalodában rögzítik, a mesterséges termékenyítő állomásokon több, eltérő méretű bikát alkalmaznak, hogy a minden ugró bika számára akadjon megfelelő méretű partner, illetve állatvédelmi szempontból is indokolt az álló bikát néhány fedezésenként váltani. Állatvédelmi és higiéniai megfontolásokból egyre gyakrabban alkalmazott fedezőpartner a fantom, ami lehet mozgó vagy fix. Előnye az élő partnerrel szemben, hogy könnyen tisztítható,

fertőtleníthető, cserélhető fóliával letakarható. Léteznek modellek, amikben beépített műhüvely található (PÉCSI, 2007).

A higiénikus és stresszmentes spermavétel kulcsfontosságú, hogy megfelelő minőségű ondót kapjunk, ezért a spermanyerés környezete is meg kell, hogy feleljen bizonyos szempontoknak. Az ejakulátumban előforduló mikroorganizmusok a női nemi utakba kerülve gyulladást okozhatnak, emellett a hímivarsejtek élettartamát és termékenyítőképességét is csökkentik. A tisztaság megkövetelt minden résztvevő és eszköz tekintetében. Előnyös, ha az ugratóhelység fedett, illetve legyen pormentes és könnyen takarítható, ugyanez vonatkozik a padozatra és a laboratóriumra is. A folyamat minden lépésének sterilnek és csíramentesnek kell lennie, így nem kerülhet be szennyeződés a dolgozókról és az állatokról sem. Az apaállatokat ha szükség van rá, fedezés előtt meg kell tisztítani, ahogyan az esetleges élő fedezőpartnereket és fantomokat is (HARASZTI-ZÖLDÁG, 1993).

Minden ugrásnál új, sterilizált műhüvelyt kell alkalmazni. Ennek módja hideg vizes öblítést követően a 20 percen át tartó forralás, vagy 180 °C-on történő sterilizálás autoklávban. A spermafogó üvegedények csíramentesítése szárítószekrényben történik 3 órán keresztül, szintén 180 fokon. A síkosító anyag kezelése is fertőzésmentes legyen, és törekedni kell arra, hogy a spermavétel során a keresés alatt a bika ne érintse többször hímveszőjével a műhüvely nyílását, ugyanis a tasakban fordul elő a legtöbb mikroorganizmus, ha ez megtörténik, a sperma szennyeződhet (GERE et al, 1998).

Megfelelő előkészítéssel növelhető a sperma mennyisége és mindemellett a minősége is jobb lesz. Ehhez szükséges az első ugrás előtti pár perc várakozás, illetve a 3-5 ejakuláció nélküli vakugrás, ami hatására mérések bizonyították, hogy az élő spermiumok száma megnövekedett az ondóban. Szintén jó hatással bír az ugratás előtti járatás és az, ha a bikák látják egymást fedezés közben. Szintén a mennyiségre ható tényező a spermavételek között eltelt idő, a túlzott gyakoriságú ugratás kedvezőtlenül befolyásolja a hímivarsejtek mennyiségét. Bikák esetében a heti 2-3 alkalom, ezen belül a napi két ugratás, közöttük legkevesebb 30 percnyi pihenési idővel bizonyult a leghatékonyabbnak (PÉCSI, 2007).

A spermavételhez minimum két technikus szükséges, egy, aki felvezeti és tarja az ugró állatot, és egy, aki a spermavételt végzi. Ennek több módja ismeretes, élő fedezőpartnernél a technikus jobb oldalról a bika mellett állva, a felugrás után a tasakot megfogva, a műhüvelybe irányítja a hímveszőt. Fontos, hogy közvetlenül ne érintse a péniszt, mert akkor megszakadhat a reflexláncolat. A műhüvelyt a bika az utólökés bekövetkeztével, a leugrás során távolítja el. Fantom esetén az eljárás megegyezik az előbb ismertetettel, de ülhet a fantom alatt is a technikus, illetve vannak a fantomba beépített műhüvelyek is, ilyen esetben nem kell technikusként kezelni azt a felugrás során (PÉCSI, 2007).

Rendkívül lényeges, hogy a bikák megfelelően azonosíthatók legyenek és az azonosítás meg is történjen, a bika száma rákerüljön a spermavétel után közvetlenül a mintára. Az ejakuláció után a műhüvely szelepét kinyitják, és függőlegesen tartják, hogy a sperma lefolyjon az ondógyűjtő üvegbe. Ezután a csövet mihamarabb 30-32 °C-os vízfürdőbe helyezik, hogy a spermiumok ne pusztuljanak el a hirtelen és drasztikus hőmérsékletváltozástól. A duplafalú spermavételi pohárnál ezt a szerepet ellátja a pohárba töltött meleg víz (GERE et al., 1998).

2.3. Spermatogenezis és spermioogenezis

A hímivarsejtek a here exokrin működése során keletkeznek, a folyamatot spermatogenezisnek nevezzük. Beleértjük a csírasejtek keletkezését és a különböző csírasejtérési, differenciálódási szakaszokat is. Ez utóbbiaknak három szakaszát különítjük el, az első szakasz során a fajnak megfelelő kromoszómaszámmal rendelkező, differenciálatlan csírasejtek mitotikus osztódása és fejlődése történik. Ezt követi a meiózis szakasza, amikor a sejtek számfelező sejtosztódása eredményeként létrejönnek a haploid ivarsejtek. A harmadik szakaszban befejeződik a sejt érése és kialakul a spermioogenezis során a végleges spermium. A folyamat az embrionális életszakaszban indul, majd egy fejlettségi stádiumban ivarérettségig stagnál, amely bekövetkeztével befejeződik a spermium érése (BECZE, 1983).

A folyamat a primordiális csírasejtekből kialakuló törzssejtekből, a korai spermatogóniumokból, amelyek a herecsatornácskák alaphártyáján találhatóak, indul ki, a pubertáskor végén, ez bikáknál 7-8 hónapos kor. Az össpermatogóniumok számtartó sejtosztódással két A-spermatogóniummá osztódnak, ezen sejtek közül csak az egyik, az A₂-típus osztódik tovább és megy keresztül több mitózison, a másik, A₁-típus pihen. A számtartó sejtosztódások hatására az A₂-es spermatogónium A, intermedier és B (B₁- és B₂-) típusú sejt-fázisokon megy keresztül, míg végül elsőrendű spermatocitává alakul, amelynek még a szomatikus sejtekhez hasonlóan diploid kromoszómaállománya van. Ahhoz, hogy az ivarsejtekben megkívánt egyszeres kromoszómakészlettel rendelkezzen, az elsőleges spermatocita átlépi a vér és here közötti sorompót és átesik a számfelező sejtosztódáson, melynek végeredményeként kialakulnak a gömbölyű másodrendű spermatociták. Ezek további számtartó sejtosztódáson keresztülmenve spermatidákká fejlődnek, egy elsőrendű spermatocitából négy darab spermatida keletkezik. Ezek a sejtek azonban még messze állnak attól, hogy termékenyítőképesek legyenek, habár DNS-állományuk már megegyezik a majdani spermiuméval. A spermioogenezis folyamata alatt alakulnak át spermiumokká (STAUB-JOHNSON, 2018).

A spermioogenezis a magban és a citoplazmában végbemenő összetett folyamatok összessége, amely során kialakulnak a hímivarsejtek jellegzetes szerkezeti elemei, a farok és az akroszóma. A változások a csírahámban kezdődnek és a mellékherében fejeződnek be. A magban történő változások során fokozatosan megnyúlik a spermatida magja, az elsőleges morfológiai rendellenességek is erre az időszakra vezethetők vissza (BECZE, 1983).

A citoplazmában végbemenő változások négy szakaszra oszthatók, ezek a Golgi-, sapka-, akroszomális és az érési szakasz. A Golgi-szakasz alatt a Golgi-apparátus egyik centriólumából megkezdődik a faroknyúlvány képződése, míg egy akroszomális granulum és a leendő sejtmag összeolvadásából az akroszóma jön létre. A sapka szakaszban az akroszomális granulum a mag felülete fölé emelkedve sapkát képez és befedi a mag elülső felét. A faroknyúlvány tovább fejlődik és kialakulnak a sejt mozgatásáért felelős rostok, a filamentumok, amik a farok rostos hüvelyét alkotják. Az akroszomális szakasz során jelentős változásokon megy keresztül valamennyi sejtalkotó, az akroszóma, a mag, a citoplazma és a faroknyúlvány egyaránt. A mag a középpontból a sejt szélére vándorol és elkeskenyedik, a kromatinállománya tömörödik. Az akroszóma szintén felveszi a mag elkeskenyedett formáját, míg a citoplazma a faroknyúlvány kezdeti része köré gyűlik és a benne lévő kromatoid test gyűrűforma szerkezetet alakít ki a rostok körül. A

mitokondriumok is idevándorolnak, hogy kialakítsák a spermium közepdarabjának mitokondriális hüvelyét. Az utolsó szakaszban fejeződik be az átalakulási folyamat, a spermium felveszi a végleges alakját. A fölösleges plazma és sejtalkotók felszívódnak (BECZE, 1893).

A teljes spermatogenezis kb. 52 napot ölel fel, egy darab A-spermatogóniumból elméletileg 64 ondósejt jön létre, a valóságban azonban ez kevesebb lehet a hibás sejtek eliminálása végett. Naponta egy ivarérett bika 8 milliárd körüli ondósejtet képes termelni, a termelés ciklusos hullámokban fut le, ennek szabályozása a Sertoli sejtekben a vegetatív idegrendszer és az ivari hormonok ciklikus kiürülése révén történik. Az érési szakasz a mellékherében 10-12 napot vesz igénybe, így összesen 9 hétig tart egy spermium kifejlődése. A negatív impulzusok, mint a hőstressz, takarmányozási hibák, vagy toxikus anyagok azonnal kifejtik a hatásukat a spermiumtermelésre, azonban a tényleges kár csak 9 hét múlva realizálódik a hím csökkent termékenyítőképességén keresztül (GERE et al., 1998).

A nyugvó spermatogónium újból törzssejtté válik és osztódni kezd, amikor a testvérsejtje osztódása során elsőrendű spermatociták keletkeznek, vagyis a kanyarulatot herecsatornácskákban folyamatosan megtalálhatók a különböző fázisokban lévő sejtek. Ez a folyamat, a törzssejtek megújulása biztosítja a spermiumtermelés folyamatosságát. A mitotikus osztódások során sok spermatogónium elfajul, a veszteség a folyamat végére 27-37% (BECZE, 1983).

2.4. A mesterséges termékenyítéshez használt sperma minőségellenőrzése

Az ondóvizsgálat talán a mesterséges termékenyítés egyik legfontosabb lépése, ugyanis elsődlegesen ekkor van lehetőség az örökítőanyag szelektálására. Csökkent fertilitású ondó használata a nagyszámú termékenyítések miatt jelentős anyagi és időbeli veszteséget jelenthet a visszaivarzások miatt, a baktériummal terhelt minta pedig akár fertőzést is okozhat az inszeminált állat szervezetében. A vizsgálatokat természetük alapján három csoportba sorolhatjuk: vannak makroszkópos, műszeres és biológiai vizsgálatok (PÉCSI, 2007).

Az ondó makroszkópos vizsgálata során az ondó mennyiségét, színét, szagát, állagát, kémhatását és az idegen anyagok jelenlétét állapítjuk meg. Az ejakulátum mennyisége sok tényezőtől függ, így az állat fajtától, fajtájától, korától, a napi ejakulációk számától, vagyis a kihasználtság mértékétől, a takarmányozási viszonyoktól, az állat egészségügyi állapotától, stb. Léteznek szezonálisan ivarzó állatok is, amelyeknél az időjárás és az évszakok változása is beleszól a spermatermelésbe. BECZE (1983) szerint a fiatal bika spermája 2-3 ml körül mozog, míg kifejlett állatoknál ez 6 ml. 2 ml-nél kevesebb ondót nem éri meg feldolgozni. A bika ondójának fehérnek, elefántcsont színűnek, esteleg a takarmány hatására sárgásnak kell lennie. A vöröses, barnás elszíneződés vér jelenlétére utal, az ilyen mintát nem szabad termékenyítésre felhasználni. Az ondó jellegzetes fanyar, istálló szagú, oda nem illő szag idegen anyag, pl. vizelet, genny jelenlétére utal. A konzisztenciája az alakos elemek számával van összefüggésben, a megfelelő ondó tejszínszerű állagú. Fokozottabb kihasználtság esetén hígabb, a tejszerű sperma még felhasználható mesterséges termékenyítéshez, azonban az ennél hígabb, vízszerű mintában már nem elég a spermiumok száma. A pH-t elektromos pH-mérővel vagy indikátorpapírral mérik, a friss ondó enyhén savas, 6,2-7 pH-jú. A pH lúgos irányba való eltolódása a járulékos nemi mirigyek megbetegedését jelezheti és a spermiumok anyagcseréjét és mozgását is kedvezőtlenül befolyásolja. Idegen anyagok jelenlétekor a mintát meg kell semmisíteni. Idegen anyagok származhatnak a spermavétel során a környezetből, pl. alom, bélsár, vagy a spermát adó apaállat szervezetéből (PÉCSI, 2007).

A mikroszkópos vizsgálat során az ondósejtek tömegmozgását és egyéni motilitását, az ondó sűrűségét, az élő és holt sejtek arányát, az egyéb alakos elemek előfordulását és a spermiumsejtek morfológiáját bírálják. A mérésekhez mikroszkópot és egyéb műszereket használnak. A vizsgálatokat mindig előmelegített, testmeleg tárgylemezen, ún. Blom-féle kamrán, vagy fűthető tárgyasztalon végzik, illetve szükség van az üvegeszközök melegítésére is. A motilitást Blom-féle kamra segítségével tudják megvizsgálni, a tárgylemezen két gyűrűszerű vájat található, ennek köszönhetően fedőlemezzel letakarva két ondóréteget kapnak, egy vékonyabb 0,05 mm-est és egy vastagabb 0,35 mm-est, amelyek különböző paraméterek megállapítására szolgálnak. A tömegmozgást Blom-féle kamrán a külső gyűrűben, tárgylemezen pedig az ondócsepp közepén, ahol nagyobb koncentrációban fordulnak elő a spermiumok, míg az egyéni mozgást pont ellenkezőleg, a csepp szélén, illetve a belső, sekély gyűrűben vizsgálják. A sejtek mozgása összefügg a termékenyítőképesességgel, így a jó fertilitású állat mintájában erőteljes, örvénylő tömegmozgást mutatnak a spermiumok. A tömegmozgás a felületi feszültségek és az ondósejtek fejének negatív töltése hatására jön létre, a sejtek csapamba

verődnek, majd szétszóródnak, ez okozza a mikroszkópban látható örvénylést. Az ondósejtek egyedi mozgásának vizsgálatakor a sejtek egyéni mozgását és a jól mozgó sejtek arányát is megállapítják. A jó termékenyítőképességű bika spermiumainak a mozgása testhőmérsékleten élénk, előrehaladó, a motilis sejtek aránya 70% körül kell, hogy legyen. 50% alatti tömegmozgást mutató ejakulátumot nem szabad termékenyítésre felhasználni. A kórosan mozgó, vagy mozdulatlan sejtek nagyarányú jelenléte az ondó rossz minőségére utal (HARASZTI-ZÖLDÁG, 1993).

A sűrűség megállapítására többféle módszer létezik, ilyen a Blom-féle kamra és mikroszkóp segítségével végzett becslés, de objektívebb megítélésre alkalmazhatók számlálókamrák, fotométerek és részecskeszámláló berendezések is. A vértetek számlálására használt számlálókamrák, pl. a Bürker-kamra alkalmas a spermiumok koncentrációjának megítélésére is. A kamra alja adott méretű négyzetes háló, emellett ismert a mélysége is. A spermát konyhasóoldattal hígítják, majd formalinnal előlik, ezután kerül a kamrába. A kamra paramétereinek és a hígítás mértékének ismeretében kiszámítható a koncentráció, a spermiumok mikroszkóppal történő számolása után. A fotométer az ismert mértékben hígított sperma fénytörését méri, a mérés pontosságának ellenőrzéséhez számlálókamrával szükséges kalibrálni az eszközt. A részecskeszámláló berendezés a meghatározott nagyságú részecskéket ismert méretű kapillárison való átáramoltatásakor elektronikus úton számolja meg, ezen eszköz méréseit is szükséges számlálókamrával hitelesíteni. A számlálókamra kizárólagos alkalmazása a gyakorlatban időigényes, de mégsem hagyható el teljesen a műszerek kalibrálása miatt (PÉCSI, 2007).

Az élő és holt sejtek arányának megállapítására különböző sejtfestési eljárásokat alkalmaznak, mint az eozin-nigrozin festés, az opálkék festés vagy a brómfenol-kék festés. Ezen eljárások közös működési elve, hogy a holt sejtek megfestődnek, az élők viszont nem. Az élő és holt sejtek aránya szoros összefüggést mutat a motilitással, ezért a gyakorlatban nem szokás mindkettőt elvégezni, hanem általában csak a motilitást figyelik, azonban a vitális festések alkalmazhatóak ezen eredmények szűrőpróbaszerű ellenőrzésére. Az idegen anyagok megállapítása mikroszkópos vizsgálatok során történik, a részletes felderítést fixált és festett preparátumokon lehet elvégezni. A vizsgálatok során az összes nem odaillő sejtet keresik, mint pl. a vörösvértesteket, amik vérzésre, a fehérvérsejteket, amik gyulladásos folyamatokra utalnak, illetve a nemi traktusból, elsősorban a tasakból származó hámsejteket, amik megnövekedett száma szintén gyulladásos megbetegedéseket indikál. Ezen kívül keresik az éretlen és rendellenes ondósejteket is, amik bikánál 1-2%-ban még elfogadhatók, azonban ennél magasabb arányban kóros állapotot jeleznek (PÉCSI, 2007).

A biológia próbák az ondóban lezajló élettani folyamatokból következtetnek a spermiumok ellenállóképességére és a termékenyítőképességére. Két fő csoportját különböztetjük meg ezeknek a próbáknak, a sejtek oxigénfogyasztását és az anyagcserefolyamatokat mérőket. Citorespirométerrel megállapították, hogy a jobb termékenyítőképességű bikák sejtjei intenzívebb oxigénfogyasztók. Az anyagcserefolyamatokat redukciós próbával mérik, metilénkékoldatot adnak az ondóhoz, ami a sejtek anyagcserefolyamatai eredményeként felszabaduló hidrogén hatására redukálódik és elszíntelenedik. Minél nagyobb a sejtek életképessége, annál nagyobb az anyagcserejük és annál gyorsabban következik be az elszíntelenedés. Kiváló minőségűnek számít a termékenyítőanyag, ha 3-4 percet vesz igénybe a színváltozás, a használhatóság határértéke 6-10 perc, ennél hosszabb idő felett már kiselejtezik a mintát. Az

ellenállóképesség is összefügg a termékenyítőképességgel, így ennek megállapítására rezisztenciapróbát alkalmaznak. Az ondót sorozatosan hígítják, majd mikroszkóp alatt figyelik a sejtek mozgását. Jó minőségű bikaondó 20 000-40 000-szeres hígítású is lehet, 10 000 alatt azonban nem alkalmazzák a spermát mesterséges termékenyítésre. A hőtűrőpróba során 46°C-os vízben vizsgálják a sejtek hővel szembeni ellenállóképességét egy órán át, a jó minőségű ondóban 20% alatti a sejtek pusztulása. Az élettartampróba a sejtek eltárolhatóságát igyekszik felderíteni, a kémcsöveket +4 °C-on tárolják és naponta vizsgálják. Jó minőségű ondóban a sejtek 65-70%-a még 5 nap múltán is életben van (HARASZTI-ZÖLDÁG, 1993).

2.5. Spermiummorfológia jelentősége, vizsgálati lehetőségei

A termékenyítés hosszú és viszontagságos folyamat, így a sikeres véghezviteléhez kulcsfontosságú, hogy a hímivarsejtek megfelelő felépítéssel rendelkezzenek és be tudják tölteni funkciójukat. Ezért kiemelt fontosságú a spermiummorfológia területe, hiszen a mesterséges termékenyítés folyamán még több sejtkárosító hatáson esnek át a spermiumok, mint a természetes párzás során. Gondoljunk csak szarvasmarhánál a sejtfagyasztás és felolvasztás procedúrájára, vagy a számos laboratóriumi vizsgálatra, a spermahígításra és a spermavételtől az inszeminálásig eltelő, gyakran nem kevés idő tényezőjére. A sejtek törvényszerűen bekövetkező amortizációja mellett a gyűjtés és kezelés során elkövetett emberi hibák is csökkentik a termékenyítőképeséget. Emellett a morfológiából következtethetünk számos, az állat szervezetében zajló folyamatra, úgy, mint a spermatogenezis vagy spermiogenezis lefolyása során felmerülő problémákra vagy a járulékos nemi mirigyek fertőzésére. Így hát fontos tudni a sejtek felépítését és az abnormális sejtek arányát, mert a nagyszámú hibás morfológiájú sejtek jelenléte az ivarszerveket érintő problémák mellett a csökkent fertilitás tényét is magában hordozza. A hagyományos mikroszkópos morfológiai vizsgálat a hétköznapi gyakorlat során túlságosan időigényes és nagy tapasztalatot igénylő feladat, így a rutinmunka során nem alkalmazzák. Viszont mesterséges termékenyítésbe újonnan belépő bikánál vagy később jelentkező problémák esetén részletes morfológiai analízist kell lefolytatni. Ha megfelelő módon lett elvégezve a vizsgálat, a csökkent termékenyítőképeségű hímek kiselejtezésének alapjául szolgálhat. Azonban a tesztek megbízhatósága nagymértéken függ a vizsgálatok körülményeitől, hogy megfelelő protokollt és eszközöket alkalmaztak-e (NAGY et al. 2013).

A vizsgálatot általában fixált és festett keneteken szokták végezni, azonban alkalmazhatóak hígított festetlen preparátumok is, ez utóbbiak előnye, hogy nem keletkezik műtermék, azonban a részletek is kevésbé látszanak. A sejtfestési eljárások előzménye a sperma hígítása, majd kenetkészítés. A tárgylemezre cseppentett, másik tárgylemezzel lefedett ondót szobahőmérsékleten beszárítják, majd alkohollal fixálják. Ezután következik a festési eljárások egyike, az, hogy melyiket alkalmazzák, a vizsgálat céljától is függ. A hagyományos festési eljárások közé tartozik a teljesség igénye nélkül a metilénkék-festés, eozin-nigrozin-festés, opálkék festés, Giemsa festés, Feulgen-féle festési eljárás, stb (PÉCSI, 2007).

Napjainkban a lassú, munkaigényes és szubjektív spermiumbecslési eljárásokat felváltják a gyors, objektív és precíz számítógépes technológiák. A két leggyakrabban alkalmazott ilyen módszer a számítógép-asszisztált spermiumvizsgálat (CASA) illetve az áramlási sejtanalízis, azaz flow citometria. Mindkét módszer számítógépes szoftverek segítségével objektív értékek alapján és reprodukálható módon elemezi a spermát. A CASA képes meghatározni az ejakulátum koncentrációját, a sejtek morfológiáját és motilitását, emellett olyan spermaminőséget befolyásoló tulajdonságokat is, mint a sejtek vitalitása és DNS-fragmentáció (ZUIDEMA et al., 2021).

Még hatékonyabb és nagyobb teljesítményű módszer a flow citometrán alapuló spermiumvizsgálat, amely másodpercenként akár 1000-2000 spermiumot is képes megvizsgálni. A spermiumok a hordozófolyadékban áramolva egyenként áthaladnak egy lézersugáron, majd az optikai rendszer a sejtek által visszavert fényből és a sejt fluoreszcencia intenzitásából nyer információkat a sejtek méretéről, összetettségéről, DNS-tartalmáról, stb. A mintához adott különböző fluoreszcens festékek gerjesztése által

lehetővé vált az olyan spermiumminőséget meghatározó tényezők, mint az akroszómaintegritás, mitokondriális membránpotenciál vagy a kromatinstruktúra vizsgálata, illetve különböző, a fertilitást befolyásoló biomarkerek felderítése. A módszer egyik kiemelkedő előnye, hogy a sejtekről egyenként szolgáltat információt, lehetővé téve ezzel a bika termékenyítőadagonkénti értékelését is. Jelenleg is ezt a technológiát használják spermaszexáláskor, amikor is egy DNS-hez kötődő fluoreszcens festék segítségével mérik a sejt DNS-tartalmát, szétválogatva az X és Y kromoszómával rendelkező sejteket. A technika további kiaknázásra váró potenciált rejt magában biomarker alapú spermaszelekciós eljárások, a sperma szexálás kíméletesebbé és hatékonyabbá tétele, illetve spermafagyasztási toleranciával összefüggő gének meghatározása formájában. A technológia haladása egyéb vizsgálati módszerek elterjedését eredményezheti, mint pl. a képalkotó áramlási citometria (image-based flow cytometry), amely képes a sejtekről egyesével képet készíteni, ezáltal lehetővé téve biomarkerek sejten belüli beazonosítását (ZUIDEMA et al. 2021).

Szintén automatizált spermaértékelési mód az automatizált spermiummorfológiai analízis, ASMA, amely először emberre lett kifejlesztve, majd más fajokkal kapcsolatban, pl. szarvasmarhán is alkalmazták. A hagyományos ASMA vizsgálat során a fénymikroszkóp egy képanalizáló szoftverrel van összekötve és a spermium feji részének paramétereit méri, úgy mint a hossz, szélesség, terület, kerület vagy egyéb részek, mint az akroszóma, középrész vagy farokrész. A spermium fejének számszerűsített adatai bizonyítottan összefüggésben állnak a sejt kromatinstruktúrájával, így általuk megítélhető a sejtek termékenyítőképessége. Az ASMA technika megbízható eredményeket hoz, azonban a nem egységes festési eljárások miatt az eredmények nehezen összehasonlíthatók különböző kutatások között (NAGY et al., 2023).

A hagyományos fénymikroszkóppal történő szubjektív morfológiai analízis változó eredmények hoz a különböző technikák, kenetkészítések és értékelési rendszereknek köszönhetően. A vizsgálatok kevéssé megismételhetők és számos esetben nem hordoznak statisztikai jelentőséget, mert nem lett elég számú hímivarsejt megvizsgálva, ami nagyon időigényes elfoglaltság, így elengedhetetlen a kutatás és az iparág szempontjából a hatékonyabb módszerek alkalmazása. Azonban sem a flow citometria, sem az ASMA módszer nem képes a spermium morfológiai vizsgálatára. Erre keresve megoldást, a slit-scan flow citometriát (SSFCM) sikeresen alkalmazták több emlősfajta spermiumfejének mérésére, DNS-specifikus fluoreszcens festékek segítségével. A módszer alkalmas lehetne a spermiumabnormalitások feltérképezésére, azonban a legtöbb gyakorlatban használt flow citometria berendezés nem tartalmazza a hozzá szükséges beállításokat és alkatrészeket. Egy másik alternatív spermavizsgálati módszer a pulse shape analysis, PuLSA. A módszer sikeresnek bizonyult különböző méretű részecskék analizálásában, illetve intracelluláris fehérjék mozgásának nyomon követésében. A módszer a fluoreszcens festékkel megjelölt sejtek pulzusprofiljának magasságát és hosszát méri. A PuLSA módszer potenciálját spermiummorfológiai vizsgálatok kapcsán tesztelte NAGY és munkatársai, amely kísérlet során bika és mén spermát keverték össze különböző arányban, hogy lemodellezzék az inszemináló adagokban előforduló különböző mértékű sejtanomáliákat. A módszer jól alkalmazhatónak bizonyult a hibás minták és rossz termékenyítőképességű hímek kiselejtezésében, lehetővé téve a hosszadalmas és munkaigényes morfológiai vizsgálat elvégzését kizárólag ezeken a spermaadagokon (NAGY et al, 2023).

A spermiumok defektusai lehetnek öröklöttek, illetve szerzettek. Ezen kívül a sejten belüli elhelyezkedésük alapján, mint feji, farok- vagy középrészen fellelhető, illetve súlyosságuk alapján súlyos és kevésbé jelentős, és eredési helyük alapján különböztetünk meg spermium abnormalitásokat. A here a primer rendellenességek, mint a fej, törzs, középrész és farok defektusainak születési helye, amely a spermiogenezis zavarát jelzi. A szekunder defektusok a mellékherében alakulnak ki, ilyenek pl. a levált fej, görbült farok, proximális és disztális plazmacseppek. A harmadik eredési hely a járulékos mirigyek, vagy ejakuláció utáni folyamatok. RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ (2007) szerint a rendellenes spermiumok arányának szarvasmarhában 10% alatt kell lennie, illetve a többi paraméterben (akroszóma, középrész, farok és proximális citoplazmacseppek) az anomáliák száma nem haladja meg egyesével az 5%-ot, vagy együttesen a 10-15%-ot (AL-MAKHZOOMI et al., 2008).

Jelen gyakorlat szerint 25 különböző változatát tartják nyilván az abnormális felépítésű spermiumoknak szarvasmarhában. Blom beosztása alapján gyakran két csoportra bontják a sejtdéfektusokat, egy jelentősebb és egy kevésbé jelentős csoportba. A jelentős spermaabnormalitások közé a fejletlen, duplafejű, fej nélküli, „knobbed” akroszómájú spermiumok, a diadém defektus, a körte alakú fej, keskeny fejalap, abnormális körvonal, kicsi, abnormális alakú fej, a dugóhúzó defektus, rövidebb farok, proximális plazmacsepp, DAG-defektus és a törött nyaki rész tartozik. Kevésbé jelentékeny hibák a keskeny fej, a kicsi, normális alakú fej vagy az óriási, illetve rövid, széles fejforma, a levált akroszóma membránok, a disztális plazmacseppek, hajlott farok, vagy az idegen sejtek jelenléte. Utóbbi spermahibák is tudják a fertilitás csökkenését okozni, ha nagy számban vannak jelen az ondóban. Kutatások azt mutatták, hogy a jelentős hibatípussal rendelkező sejtek nagyobb százalékban hordoznak magukban károsult DNS-t, mint a nem jelentős rendellenességgel rendelkezők (ENCISO et al., 2011).

A fertilitás sikertelenségének két oka lehet, az első a termékenyítés megghiúsulása, vagyis a sperma nem tudott eljutni és hozzákötődni a petesejthez, a másik pedig az embrió hibás fejlődése és elhalása, ami pedig a spermium termékenyítésre való alkalmatlanságából ered. Mindkét állapot az ondó elégtelen minőségére vezethető vissza. Az imént említett okok alapján kompenzálható és nem kompenzálható spermarendellenességeket különböztethetünk meg. Kompenzálható ondórendellenességekkel bír az a bika, amelyik termékenyítőadagjában a sejtek nagy arányban csökkent életképességűek, vagy hibás morfológiájúak, pl. abnormális fej – vagy farokalakulásokat hordoznak. Ezekkel együttesen ismeretlen faktorok (funkcionális és molekuláris egyaránt) is megakadályozzák a spermium hozzáférését és kötődését a petesejthez. Az ilyen állat termékenyítőképesége csökkent, azonban bizonyos mértékig a spermiumok koncentrációjának emelésével javítható (SAACKE, 2008).

Nem kompenzálhatónak tekintjük, azokat a rendellenességeket, amik jelenlétekor a szubfertilis hím termékenyítőképesége nem javítható a termékenyítő adag sejtszámának növelésével. Azok az ondósejtek, amelyek ilyen rendellenességekkel bírnak, képesek ugyan a petesejtbe hatolni és megtermékenyíteni azt, de az embriófejlődés zavart szenved és általában korai magzatelhalást eredményez. Ennek oka, hogy az ilyen termékenyítő sejteknek hibás a kromatinállománya, azonban ez a sejt alakulásán nem mindig észrevehető, erre alkalmasak a spermium DNS-ét vizsgáló tesztek (SAACKE, 2008).

2.6. Spermaminőség és a fertilitás kapcsolata

A termékenyítés hosszú és viszontagságos folyamat, így a sikeres véghezviteléhez kulcsfontosságú, hogy a hímivarsejtek megfelelő felépítéssel rendelkezzenek és be tudják tölteni funkciójukat. A fertilitás tehát a spermium azon képessége, hogy eljuttassa a hím állat genetikai információját a petesejtig, majd egyesülve vele életképes és jól fejlődő zigótát hozzon létre. Ezen tulajdonság három tényezőtől függ, ezek a bika szexuális teljesítménye, a hímivarsejt minősége és a hím és nőtény közötti interakció hatása, amiről azonban még viszonylag kevés információ áll rendelkezésünkre. Mindhárom tényezőnek nagy jelentősége van a feldolgozás és a termékenyítés különböző fázisaiban (BOLLWEIN-MALAMA, 2023).

A fertilitásnak különböző fokait különböztetjük meg, a steriltől az optimális termékenyítőképességig terjed a skála. A sterilitás a hím teljes és végleges képtelenségét jelenti a termékenyítésre, a szubfertilis bika ondójában csökkent számú spermium található. Infertilisnek nevezik a reprodukciós képesség ideiglenes elvesztését, míg a fertilis állat ideális módon képes utódot nemzeni. A bikák csökkent fertilitási arányát számos kutatás vizsgálta, ugyanis a gazdaságosságot jelentősen befolyásoló tulajdonságról van szó. Az eredmények azt mutatják, hogy megközelítőleg minden ötödik állat alacsony termékenyítőképességű az elégtelen spermaminőségnek vagy fizikai alkalmatlanságnak, esetleg mindkettőnek köszönhetően. Ha a párzási készséget is számításba vesszük, ez az arány 4 bikából 1 csökkent fertilitású állatra növekszik (BARTH, 2018).

A bikák tenyésztésbe vételéhez három paraméternek kell megfelelniük. Ezek a fizikai állapot, a párzási kedv és a spermaminőség kielégítő megléte. Ezeken kívül a betegségektől való mentesség is elengedhetetlen követelmény. A spermaminőséget és mennyiséget számos tényező befolyásolja, többek között az állat kora, kondíciója, mind a túlzott plusz, mind a mínusz kondíció negatívan hat a fertilitásra. Az állat egészségi állapota és a fizikai abnormalitások, kiemelten a láb, herezacskó és herék állapota is befolyásolja a termékenyítőképességet. A herekörméret bizonyítottan összefüggésben áll a spermiumok minőségére, a nagyobb herekörmérettel rendelkező hímek spermiumaiban nagyobb számú élő és morfológiailag egészséges sejtek találhatók. A környezeti tényezők, mint az évszak és fotoperiódus hatása, összefüggésben a táplálkozással és a takarmány minőségével különösen a szabadon tartott állatokon érezteti hatását. Mindezek mellett az emberi kezelés is eredményezheti a spermium minőségének romlását (BARTH, 2018).

Ahhoz, hogy a sperma részt vehessen a termékenyítésben, előbb át kell esnie a laboratóriumi vizsgálatokon. Ez a mesterséges termékenyítőállomásokon a spermavétel után azonnal megvizsgálják az ejakulátum színét, sűrűségét, szennyező és idegen anyagok jelenlétét, az ondó mennyiségét a súlya alapján, illetve a spermiumok koncentrációját, általában fotométert használva. Ezen kívül a spermiumok motilitása és a morfológiailag abnormalis sejtek is felderítésre kerülnek. Ezen felsorolt tényezők alapján következtetnek a fertilitásra és az eredmények alapján kerül a termékenyítőadag tovább feldolgozásra vagy selejtezésre. A fagyasztás utáni motilitásvizsgálat is rutin, ugyanis ellenőrizni szükséges, hogy a sejtek túléltek –e a mélyhűtést. A spermiummorfológiai vizsgálatok megbízhatósága vitatott, tekintve a vizsgáló szubjektivitását, a megszámlolt sejtek elegendő mennyiségét, illetve a különböző értékelési rendszereket (AL-MAKHZOOMI et al., 2008).

Ezután veszi kezdetét a sperma termékenyítésben való felhasználásának időszaka, amely során meghatározzák a hím fertilitását. Erre leggyakrabban a termékenyülési arányt alkalmazzák, vagyis hogy termékenyítés után általában 56 nappal számolva hány nőtény nem ivarzott vissza, ez a non-return rate (NRR). Ez a mutatószám egyszerű, de nem pontos meghatározása a bika termékenyítőkéességének, ugyanis a visszaivarzásokat számos egyéb tényező is befolyásolja, így a NRR helyett egy statisztikailag korrigált számot, a corrected non-return rate-et (CNRR) használnak, ami számításba veszi ezeket a befolyásoló hatásokat is. Ezt a számot időről időre újrakalkulálják az elvégzett termékenyítések fényében (AL-MAKHZOOMI et al., 2008).

A spermaminőség és fertilitás kapcsolata komplex, minden egyes spermiumnak rendelkeznie kell számos olyan tulajdonsággal, ami elengedhetetlen abban, hogy meg tudja termékenyíteni a petesejtet. A laboratóriumi sperma vizsgálatok során csak néhányat ellenőriznek ezen tulajdonságok közül, ezért a vizsgálatok nem tudják pontosan megítélni a minta fertilitási potenciálját, azonban arra alkalmasak, hogy a rossz termékenyítőkéességű ejakulátumokat kiselejtezzék. A spermaminőség ellenőrzések célja, hogy megítéljék a spermaminta potenciális fertilitását gyors és olcsó módszerek segítségével (MOCÉ-GRAHAM, 2007).

A laboratóriumi in vitro vizsgálatok során a spermium azon tulajdonságait vizsgálják a fertilitással összefüggésben, amik elengedhetetlenek ahhoz, hogy a sejt képes legyen a funkcióját betölteni és sikeresen elvégezni a termékenyítést. Ezek a vizsgálatok a sperma motilitásra, a morfológiára, a plazmamembrán integritásra, a mitokondriális aktivitásra, a sejt kapacitációs képességére és az akroszóma reakcióra, valamint a petesejthez való kötődés és termékenyítés képességére és DNS épségére terjednek ki. Számos kutatás talált összefüggést az in vitro tesztek eredményei és az in vivo fertilitási arányok között, azonban a korrelációk nagyfokú változatosságot mutatnak egyes kutatások között (RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, 2007).

A motilitásvizsgálat azon vizsgálatok egyike, amit minden alkalommal elvégeznek. A vizuális vizsgálata a spermiumok mozgáskéességén egyszerű és nem igényel költséges felszerelést, azonban csak egy fontos attribútumot vizsgál és nagymértékben befolyásolja az emberi szubjektivitás. Ez a humán tényező kiváltható fényképes analízis, vagy számítógépes spermamotilitás vizsgálat (CASA) alkalmazásával. A másik standard rutinvizsgálat a morfológia, ugyanis ahogy a motilitás, úgy a morfológia kapcsolatát is megállapították a fertilitással. Nagyobb százalékban abnormális morfológiájú sejteket tartalmazó ondó in vivo fertilitási értékei alacsonyabbak lettek, mint azon mintáké, amiben nagyobb arányban voltak a helyes felépítésű sejtek. A morfológiai vizsgálatok elvégezhető vizuálisan vagy automatizált morfometriás becslések által. Néhány spermiummorfológiai defektus kompenzálható a sejtek számának megnövelésével az inszeminálóadagban, míg másoké nem (MOCÉ-GRAHAM, 2008).

Az olyan sejt tulajdonságok, amelyek a sejt integritását befolyásolják, létfontosságúak ahhoz, hogy a sejt megfelelő felépítéssel rendelkezzen és képes legyen a feladatát betölteni. Ilyen tulajdonság a plazmamembrán integritás és stabilitás. A spermium sejthártyájának három jól elkülöníthető részét különböztetjük meg, habár egy egybefüggő sejtalkotóról van szó. Ezek a részek a külső akroszomális membránt borító, a posztakroszomális sapka részt, illetve a közép- és farokrészt fedő részek. A klasszikus vizsgálatok a sejt életképességét állapítják meg a sejthártya épsége által különböző

membrán-impermeabilis festékeket alkalmazva. Azon sejtek, amelyek megfestődött, nem működik megfelelően a sejtfala, tehát halottnak tekinthető. Ilyen eljárások a konvencionális vitális festékek, mint az eozin-nigrozin festés, vagy az újabban alkalmazott a sejt DNS-éhez, vagy a citoplazmában lévő enzimhez kötődő fluoreszcens festékek, p. a propidium-jodid vagy az etidium-bromid. Ezek a festések a posztakroszomális plazmamembrán integritását képesek felderíteni, az akroszomális rész épségét a külső akroszomális membránnal együtt szokták vizsgálni, friss vagy fixált spermiumokon, mikroszkópos, fluoreszcens sejtfestési vagy áramlási citometriás módszerekkel. A középrész membránintegritását motilitásvizsgálatokkal, vagy hipoozmotikus teszttel (HOS) szokták megállapítani (MOCÉ-GRAHAM, 2008).

A mitokondriális aktivitás is összefüggésben van a sejt életképességével és motilitásával, és vagy közvetetten, motilitásvizsgálatok által, vagy közvetlen módon, speciális fluoreszcens festéssel, (pl. rodamin 123, JC-1) mérhető, amelyek az aktív és inaktív mitokondriumokat jelölik meg. A sejtekről kibocsátott vörös vagy zöld szín aránya alapján lehet megállapítani, hogy működnek-e, a mozgásképes hímivarsejtek több vörös fényt bocsátanak ki, míg a mozgásképtelenekben nagyobb a zöld szín aránya a vöröséhez képest (MOCÉ-GRAHAM, 2008).

A petesejt megtermékenyítéséhez a hímivarsejtnek előbb egy összetett a membránt és a sejt belső összetételét egyaránt érintő enzimreakció-sorozaton kell végigmennie, ez a kapacitáció folyamata. A friss ejakulátum spermiumai még nem képesek a kapacitációra, mert a szeménális plazma fehérjei stabilizálják a membránjukat. Ahhoz, hogy a membránok destabilizációja megtörténjen, a sejteknek a női nemi utak szekrétaiban kell időzniük, amely hatására megváltozik a membrán összetétele. Ez a folyamat előidézhető in vitro körülmények között is, a vizsgálat célja pedig, hogy felmérjék, melyik spermiumok képesek a kapacitációra, ami előfeltétele az akroszóma reakciónak, ami a termékenyítés megtörténéséhez szükséges. A kapacitáció vizsgálatokor a folyamat során fellépő változásokat igyekeznek detektálni, mint pl. a plazmamembránban létrejövő lipidátrendeződés mértékét fluoreszcens festékekkel (pl. filipin, merocianin 540) és flow citometriával kimutatni, vagy a sejten belüli Ca^{2+} -szint változását CTC teszttel bebizonyítani. Az akroszóma-reakció a petesejt korona radiátájának és a zona pellucidának a megnyitását szolgálja, hogy a spermiumok be tudjanak hatolni a petesejtbe és megtermékenyíteni azt. A zona pellucida speciális enzimek biztosítják azt, hogy csak egy spermium tudja a termékenyítést elvégezni, ne alakuljon ki polispermia. Az akroszóma reakció előidézhető laboratóriumi körülmények között is a spermiumokhoz adott homogenizált és feloldott zona pellucidát tartalmazó reagenssel, vagy a belőle izolált specifikus fehérjékkel. Az akroszóma-reakcióban részt vevő sejtek felderíthetők sejtfestési módszerekkel, vagy fluoreszcens festékekkel megjelölt földimogyoró agglutininokkal. Szignifikáns korrelációt írtak le az akroszóma-reakció mértéke és az in vivo fertilitás között (RODRÍGUEZ-MÁRTÍNEZ, 2007).

A spermium sikeres kötődése a zona pellucidához kritikus lépés a megtermékenyítés során. A kötődés fajspecifikus és kizárólag a kapacitált spermiumok képesek rá, a folyamatra az akroszóma reakciót megelőzően kerül sor. A spermiumnak muszáj ép akroszómával rendelkeznie és sikeresen túlesnie a kapacitáción ahhoz, hogy a penetrációs enzimek felszabaduljanak és kötődni tudjon a zona pellucidához. In vitro körülmények között számos teszt elérhető a spermiumok zona pellucidához való kötődésének előidézésére, amelyek egész vagy hasított zona pellucidát tartalmaznak. A

kötődés bizonyítottan összefüggésben van a fertilitással, azonban a tesztek megbízhatósága vitatott, ugyanis a tesztek nem mindig foglalják magukba a sejtek kapacitációját a vizsgálat elvégzés előtt. Ha kapacitált spermiumokat tesztelnek a zona pellucida penetrálásánál, megbízhatóbban megállapítható a sejtek fertilitása. A zona pellucidában a polispermia megakadályozása miatt megragadt spermiumok fertilisnek tekinthetők, mert képesek voltak kötődni hozzá, így feltételezhetően rendelkeznek minden olyan kritériummal, ami a petesejt megtermékenyítésének ezen fázisához szükséges (RODRÍGUEZ-MÁRTÍNEZ, 2007).

A fertilitás megítélésére alkalmas teszt az in vitro termékenyítése petesejteknek. Ehhez általában zona pellucida mentes ivarsejteket használnak és az apa genetikai potenciálját a keletkező zigóta megvizsgálásával állapítják meg. A tesztek információt szolgáltatnak a spermium kapacitációs képességéről, akroszóma reakcióban való részvételéről, a termékenyítés sikerességéről és normálisan fejlődő embrió létrehozásáról. A tesztek eredményeiből következtetnek a relatív in vivo fertilitására a hím állatnak. A becslések megbízhatóságát befolyásolja a tény, hogy az ivarsejtek mesterséges közegben találkoznak, ahol a körülmények nem azonosak a természetes termékenyítés feltételeivel, emellett a felhasznált petesejteket szuperovuláció során, vagy éretlen állapotban nyerik, így nem garantálható, hogy ugyanúgy reagálnak, mint az természetes módon ovulált petesejtek. Emellett az in vitro fertilizáció során a sejtek aránya sem egyezik meg a természetes termékenyítésben részt vevő sejtekével, általában a spermium:petesejt arány túlzott mértékű, ezáltal pontatlan becsléseket eredményezve. Emellett a módszer nem teszi lehetővé a nagyszámú petesejt megtermékenyítését, így az eredmények csak hozzávetőlegesek (MOCÉ-GRAHAM, 2008).

Ilyen petesejt penetrációs tesztet végzett el 1995-ben HENAULT és KILLIAN, amikor különböző bikák spermáját eltérő színű fluoreszcens festékekkel jelölték, majd a mintákat összekeverve tesztelték a hímek termékenyítőképességét, a spermiumok in vitro termékenyítése által. A hím örökítőanyag jelenléte a petesejt plazmájában a termékenyítés sikerét bizonyította, a különböző jelölések által pedig az egyes hímek fertilitását lehetett megállapítani.

A sejt genetikai állapota nem feltétlenül befolyásolja a képességét, hogy eljusson a termékenyítés helyéig és megtermékenyítse a petesejtet, de a létrejövő embrió fejlődésében döntő szerepe van a DNS integritásának. A genetikai állomány megítélésére két út választható, vagy az embrionális fejlődés menetét figyelik erre alkalmas vizsgálatokkal, azonban ezek a tesztek költségesek és viszonylag kevés spermium értékelésére alkalmasak. A másik lehetőség a fertilitással bizonyítottan korreláló DNS integritás vizsgálata, erre négy eljárást ismernek a gyakorlatban. Gyakrabban használt vizsgálati módszerek a Comet assay és a Sperm Chromatin Structure Assay (SCSA), míg ritkábbak a TUNEL teszt és az akridin-narancs festés. Az SCSA spermium-kromatinállomány denaturációjának mértékét méri, amely kapcsolatba hozható a DNS szál törések jelenlétével, miután a minta savas kezelésnek lett alávetve. Ezután a spermiumok akridin-narancs festékekkel vannak megfestve, ami az ép DNS-t zöldre, míg a károsodottat narancsra színezi. Flow citometriával mérik az egyes spermiumok által kibocsátott zöld és vörös szín egymáshoz viszonyított arányát. Az SCSA által biztosított DNS-integritás analízis gyors és nagyszámú spermium objektív megvizsgálására alkalmas (MOCÉ-GRAHAM, 2008).

Ezek a fertilitást célzó tesztek a standard napi spermavizsgálat során nem fordulnak elő, egyelőre kísérleti jelentőségük van. A különböző vizsgálatok eredményeinek összehasonlítása számos akadályba ütközik a különböző módszerek és laboratóriumi körülmények végett. Emellett számításba kell venni a nagyfokú eltérést a bikák egyes ejakulátiumai és az egy ejakulátumon belüli spermiumok között, mind a sejtek állapota, mind a spermakezelés során tanúsított stressztűrőképességük tekintetében. Önmagában egyik vizsgálat sem tudja előrejelezni a spermium termékenyítőképességét, a módszerek kombinálása nagyobb bizonyossággal tudja a potenciális fertilitást megítélni. A vizsgálatok a vitalitást megállapító próbák és a motilitási tesztek elvégzését találták a leginformatívabbnak, ugyanis ezek a tulajdonságok több szintén is összefüggést mutatnak a fertilitással (MOCÉ-GRAHAM, 2008).

Napjainkban egyre több kutatás foglalkozik a fertilitás meghatározásával a hagyományos spermaminőségvizsgálatokat, mint mikroszkópos morfológiavizsgálat, számítógép-asszisztált sejtanalízis vagy áramlási citometria ötvözve a molekuláris biológiában használt módszerekkel. Az olyan innovatív technikák, mint a kvantitatív PCR, reverz-transzkriptáz PCR, DNS chippek (DNA microarrays) vagy nagy teljesítményű RNS szekvenálás, amik a sejt RNS és fehérjefelépítésének felderítését célozzák, segítségével lehetnek egyes, fertilitást jelző biomolekulák és markerek beazonosításának. A vizsgálatok összefüggéseket találtak számos sejtalkotó molekula és olyan tulajdonságok között, mint a spermiumok vitalitása, akroszóma-integritás és mitokondriális működés, amelyek befolyásolják a fertilitást. Mivel azonban ezekkel a hagyományos spermiummorfológia is foglalkozik közvetetten, ezek a kutatások egyelőre elméleti jelentőségűek, azonban a jövőben elképzelhető, hogy a technika fejlődése lehetővé teszi egy gyorsabb, objektív, biomarkereken alapuló spermiumszelekció létrejöttét (BOLLWEIN-MALAMA, 2023).

3. Anyag és módszer

A vizsgálatok Keszthelyen, a Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem Georgikon Campusán, az Állattenyésztési Tudományok Intézet Szaporodásbiológia laboratóriumában kerültek sorra. A kísérletben felhasznált 20 db spermamintát a Magyarartarka Tenyésztők Egyesülete bocsájtotta rendelkezésünkre. A termékenyítőadagok között termékenyítésre alkalmas és alkalmatlan adagok is szerepeltek.

A kísérletem célja a spermiumfejek területének lemérése után a kapott adatok és a termékenyítőképesség közötti kapcsolat vizsgálata volt. A keneteket Feulgen-festéssel festettük meg.

3.1 Feulgen festés

A Feulgen festést 1924-ben dolgozta ki Feulgen és Rossenbeck és azóta az egyik leggyakrabban használt festési eljárás, ami a DNS célzott megfestését teszi lehetővé. A művelet két részből áll, az első a savas hidrolízis, mely során a purin bázisok leválnak a DNS-szárlól, és szabad aldehid csoportok jönnek létre. Ezután a második lépésként hozzáadják a Schiff-reagenset (fuchsine-sulfuric acid), így a szabad aldehid csoportok összekapcsolódnak a reagensben található festékanyaggal (pararosaniline), lilás színű festődést eredményezve (CHIECO-DERENZINI, 1999). A spermiumkenetek festésére Feulgen festőkitet alkalmaztunk (Merck 1.07907.0001), a gyártó festési eljárását BARTH és OKO (1989) spermiumokra vonatkozó módosításainak figyelembevételével követve.

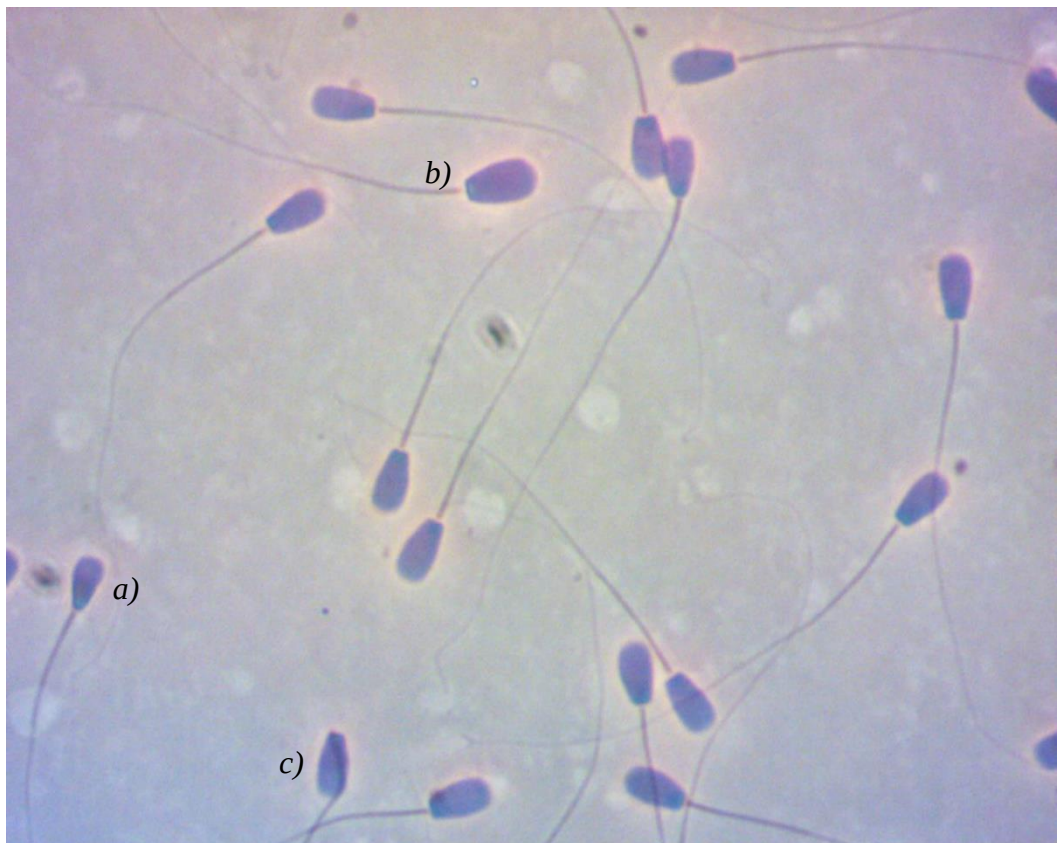
A kenetkészítés és festés menete:

1. A mélyhűtött sperma felolvasztása után egy cseppet a tárgylemezre helyezünk és a fedőlemezrel húzva kenetet készítünk és levegőn hagyjuk beszáradni.
2. A Hellendahl festőedényben a keneteket 5 mol/l koncentrációjú sósavban (HCl) tartjuk 30 percig, szobahőmérsékleten ($22 \pm 0,5^\circ\text{C}$).
3. A 30 perc letelte után 5 percig folyóvízben átöblítjük a keneteket.
4. Hozzáadjuk a mintákhoz a Schiff-reagenst 30 percre, a reagens fényérzékenysége miatt sötétben végezve a munkafolyamatot.
5. Ezt követően nátrium-diszulfid öblítőoldattal 2x3 percen keresztül átöblítjük a keneteket.
6. Ezután 10 percig folyóvízben átmossuk a mintákat.
7. A keneteket szárítást követően lefedjük.

A keneteket Olympus CX40 fénymikroszkóppal, 40x fáziskontraszt objektívvel értékeltük, bikánként 20-20 digitális fotót készítve ToupView digitális kamera és képrögzítő szoftver segítségével.



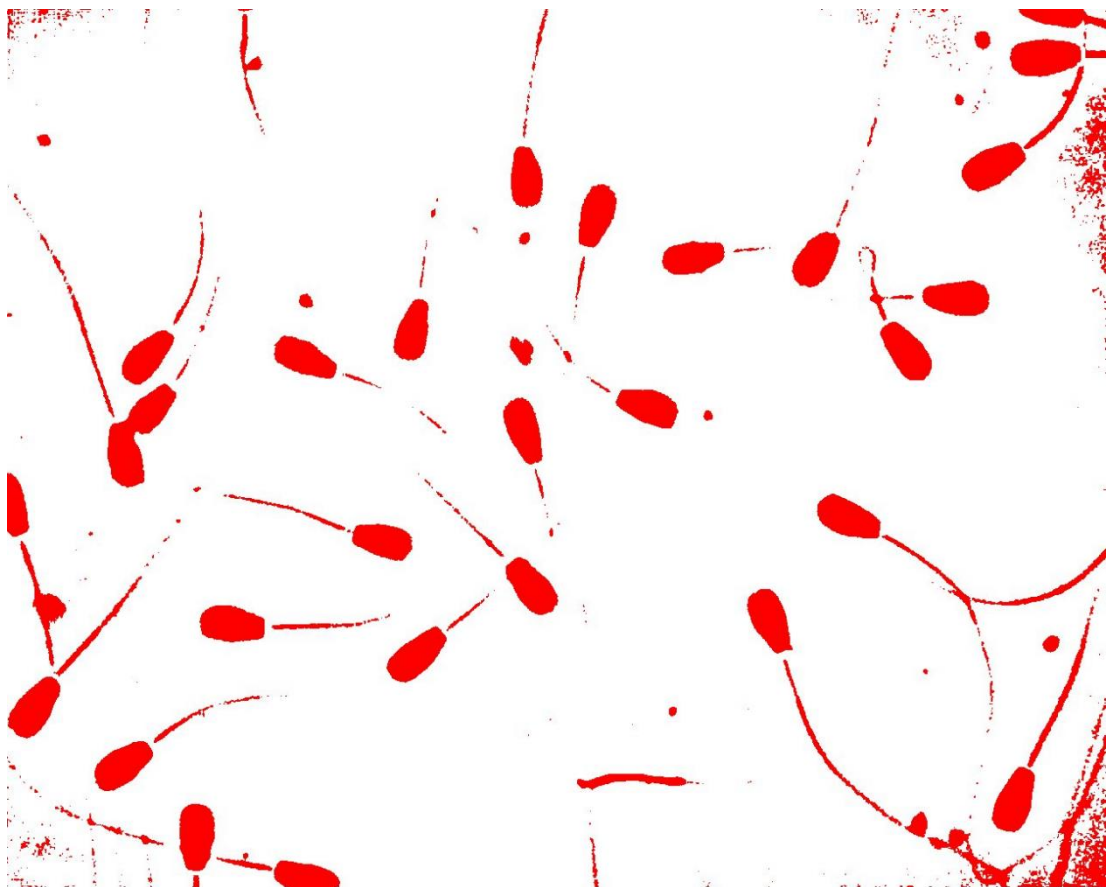
1. ábra: Feulgen festéssel megfestett bikaspermiumok (forrás: Nagy-Javkhlan)



2. ábra: Hibás morfológiájú spermiumok: a) körte alakú fej, b) nagy spermiumfej, c) törött nyaki rész (forrás: Nagy-Javkhlan)

3.2. Fotók analízisa

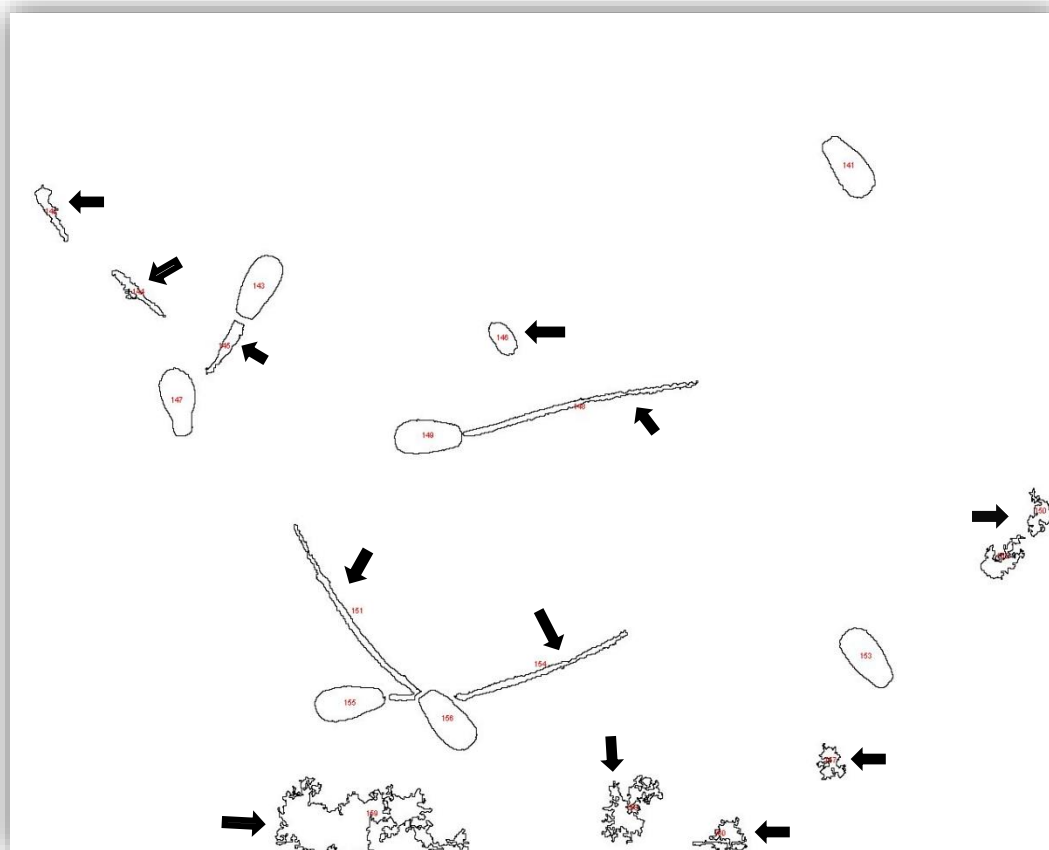
A digitális fotókat az Image-J képelemző szoftverrel vizsgáltam, a spermiumok fejének területét mértem. Ahhoz, hogy a program a sejtek körvonalát tudja mérni, a képeket 32 bitessé kellett alakítanom, majd a pixeleket NaN pixellé konvertálnom, így csak a sejtek alakja lett látható. A pixelek közötti távolság beállításához Bürker-kamrát használtam a mérések kalibrálására. A program a sejtek körvonalát jelenítette meg és a hozzájuk tartozó terület méretét adta meg μm -ben. A szoftver nem csak a sejteket, hanem a műterméket, sejttermelékét és a számomra nem szükséges farki rész területét is mérte, így az eredmények megszületése után a fotókat egyesével átnéztem és kiválogattam a spermiumfejekhez tartozó adatokat. Minden értéket eltávolítottam, ami nem ép körvonalú spermiumfejhez tartozott, így pl. a műtermékkel szennyezett spermiumfejeket vagy azokat, amik körvonalát nem éppnek érzékelt a szoftver, viszont benne hagytam a hibás morfológiával rendelkező spermiumfejek értékeit, mint pl. a körte alakú fejet. Ugyanis a morfológiai hibák befolyással vannak a fertilitásra, a kísérlet célja pedig az volt, hogy képes –e az adatelemző szoftver a spermiumfejek területének értékei alapján észlelhető különbség a rossz és jó termékenyítőképességű hímek között. A mérések során összesen 2460 db sejt adatai kerültek felvételre.



3. ábra: NaN pixellé konvertált fénykép (forrás: saját fotó)



4. ábra: Feulgen festéssel megfestett spermaminta (forrás: Nagy-Javkhan)



5. ábra: a 4. ábrán látható spermaminta Image-J szoftver által elemezett rajza, a nyilak a nem spermiumfej eredményeket jelzik (forrás: saját fotó)

3.3. Statisztikai elemzés

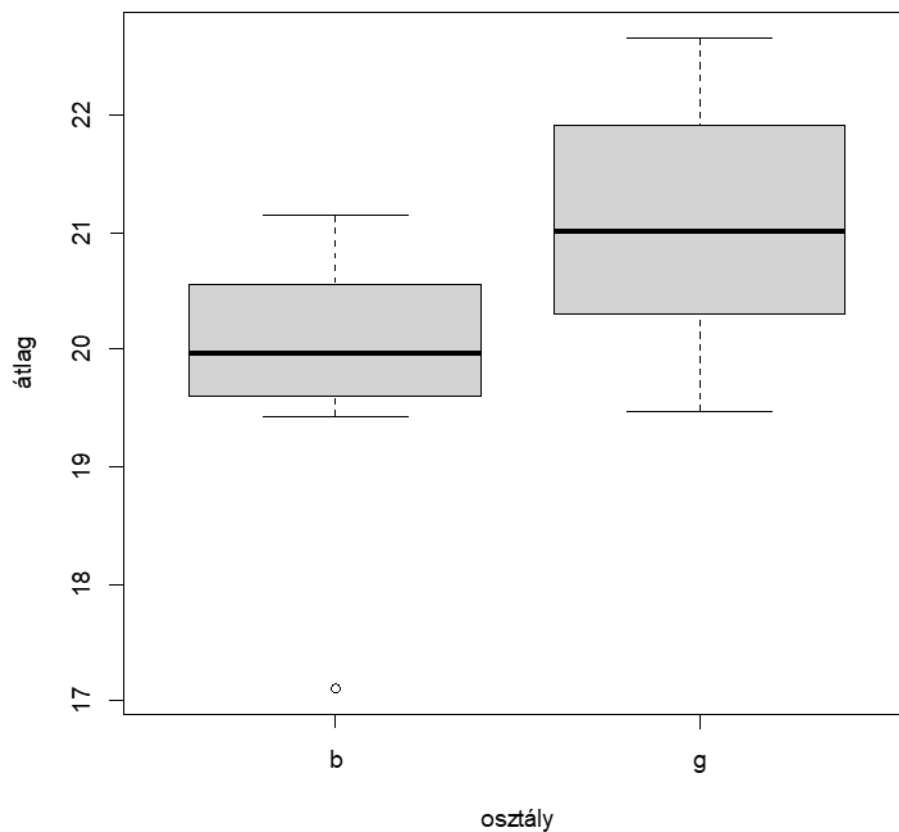
A statisztikai elemzéshez a Microsoft Excel (2016) és az R commander (2.8-0 verzió) programot használtam. A két bikacsoport, a jó és rossz termékenyítők spermiumfej területeinek eredményeit hasonlítottam össze leíró statisztikát alkalmazva. A bikánkénti fejméret átlagának és szórásának kiszámolása után kétmintás F-próbát végeztem, hogy megállapítsam a szórásnégyzetek egyenlőségét. Ezután, mivel a szórásnégyzetek egyenlők lettek, elvégeztem a két mintás t-próbát az átlag és CV értékekre a két (good és bad) bikacsoportra. A jó termékenyítő bikák 8-an, míg a szubfertilisek 12-en voltak.

4. Eredmények

A kísérlet során 20 bika, köztük jó és rossz termékenyítőképességűek spermamintáit festettük meg Feulgen festéssel, majd a kenetekből készült digitális fotókat képelemző szoftverrel analizáltam. A kísérlet célja a fejméret és a fertilitás közötti kapcsolat felderítése volt. Az *1. táblázatban* láthatók a bikák besorolása jó - good (g) és rossz - bad (b) bikacsoportba, a hozzájuk tartozó átlag, szórás (SD) és a variációs koefficiens (CV%) értéke.

BULL	OSZTÁLY	ÁTLAG	SD	CV%
bull.1	g	21,80	1,82	8,33
bull.2	g	20,78	1,59	7,64
bull.3	g	22,65	1,59	7,02
bull.4	b	20,87	1,62	7,74
bull.5	b	20,79	1,67	8,05
bull.6	b	20,15	1,80	8,91
bull.7	b	19,63	1,60	8,14
bull.8	b	19,99	1,53	7,65
bull.9	b	19,44	1,71	8,81
bull.10	g	22,02	2,10	9,53
bull.11	b	20,32	2,04	10,02
bull.12	b	19,58	1,79	9,15
bull.13	g	20,24	1,26	6,24
bull.14	b	19,84	2,17	10,92
bull.15	g	19,48	1,26	6,47
bull.16	g	20,37	2,54	12,47
bull.17	b	19,95	1,43	7,17
bull.18	b	17,11	1,84	10,74
bull.19	b	21,14	1,71	8,09
bull.20	g	21,25	1,85	8,70

1. táblázat



6. ábra: A jó (g) és rossz (b) bikacsoport fejméreteinek megoszlása az átlagok alapján

A 6. ábrán látható a két bikacsoport fejterületi értékeinek dobozos ábrája. A dobozok az interkvartilis tartományokat jelzik, az minimum értékeket a vonal alsó végpontjai, míg a maximumot a felsők. A vastag vonal a mediánt jelöli.

	Jó (g)	Rossz (b)
Tartomány	3,176	4,032
Minimum	19,476	17,112
Maximum	22,652	21,144
Medián	21,015	19,969
Átlag	21,075	19,900
Szórás (SD)	1,054	1,031
Variancia	3,176	4,032
Standard hiba	19,476	17,112
Darabszám	8	12

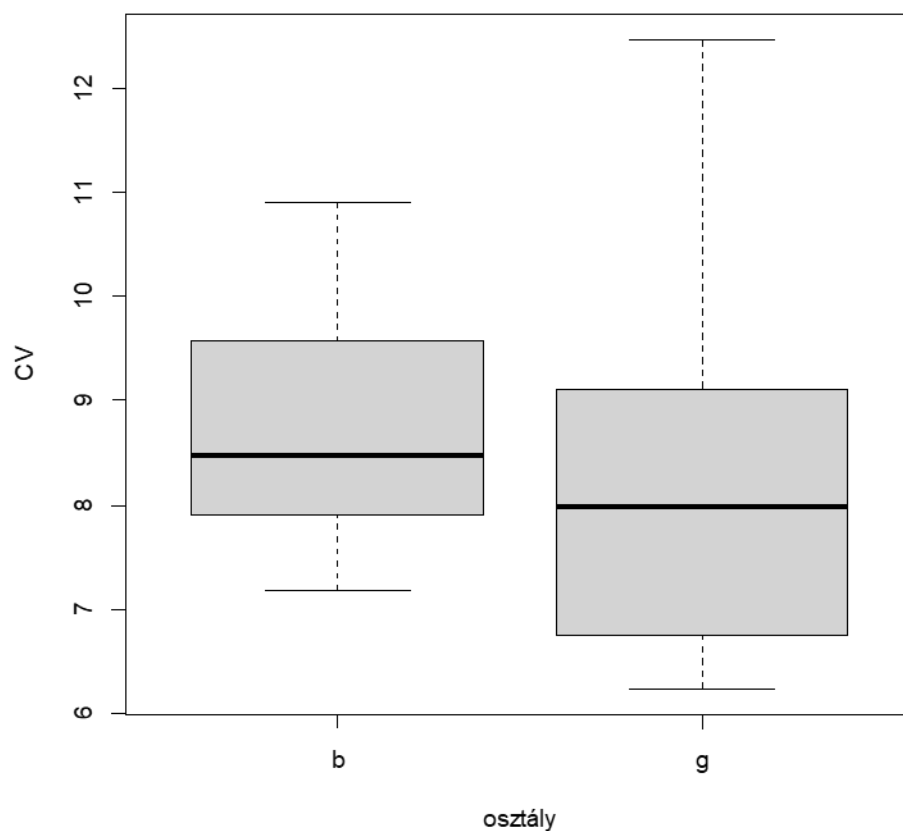
2. táblázat: A csoportok átlag adataira lefuttatott leíró statisztika értékei

A 2. táblázat és a 6. ábra segítségével vizsgálhatjuk meg a két bikacsoport egymáshoz viszonyított értékeit. A szórásnégyzetek egyenlőségének ellenőrzésére F-próbát végeztem. A $p=0,05$ szignifikanciaszint mellett az F érték kisebb lett ($F=1,046537 < F_{kritikus}=3,01233$), mint a kritikus érték, így a nullhipotézis, azaz a szórásnégyzetek egyenlősége igaznak bizonyult. Ennek ismeretében elvégeztem a kétmintás t-próbát, itt az alap hipotézis az volt, hogy a két bikacsoport fejméreteinek átlagai statisztikai szempontból megegyeznek. Szintén 5%-os szignifikanciaszint mellett az eredmények azt mutatták, hogy a nullhipotézis nem teljesül, a csoportok átlagai eltérnek egymástól, a fejterületek szignifikánsan kisebbek a rossz bikáknál ($t=2,4745 > t_{kritikus\ egyszélű}=1,7340$). Ez a különbség jól érzékelhető a 6. ábrán is.

A variációs koefficiens (CV%) értéke arra szolgál, hogy megállapítsuk a szórás százalékos arányát az átlaghoz viszonyítva, így képet kapunk a minták relatív variabilitásáról egy mértékegység nélküli szám segítségével. A két csoport összehasonlításához előbb itt is elvégeztem az F-próbát, majd a szórásnégyzetek egyenlőségéről megbizonyosodva ($F=2,747387 < F_{kritikus}=3,01233$) lefuttattam a kétmintás t-próbát a csoportok CV% értékére is. Az eredmények nem mutattak szignifikáns különbséget $p=0,05$ érték mellett ($t=0,6688 < t_{kritikus\ egyszélű}=1,7340$), így arra a következtetésre jutottam, hogy a minták között nincs statisztikai szempontból jelentős különbség az átlaghoz viszonyított szórás mértéke között. A próba eredményei a 3. táblázatban és 7. ábrán kerültek szemléltetésre.

	Jó (g)	Rossz (b)
Tartomány	6,232	3,742
Minimum	6,237	7,173
Maximum	12,469	10,915
Medián	7,984	8,475
Átlag	8,300	8,783
Szórás (SD)	2,026	1,222
Variancia	4,104	1,494
Standard hiba	0,716	0,353
Darabszám	8	12

3. táblázat: A jó (g) és rossz (b) bikacsoport CV% adataira elvégzett leíró statisztika eredményei



7. ábra: A jó (g) és rossz (b) bikacsoport fejméreteinek variációs koefficiens (CV) szerinti megoszlása box plot diagramon

Az ábrán és az adatokban is megfigyelhető, hogy a jó bikák tartománya, a minimum és maximum közötti értéktávolság jóval nagyobb, mint a rossz bikáknál. Nem mondható el ugyanez az átlagukról és a szórásukról, amik között nem mutatkozik jelentős különbség.

5. Következtetések

A kutatás régóta törekszik az objektív, számszerűsíthető és ezáltal automatizálható műszeres mérések kidolgozására a spermabírálat során, jelenleg ugyanis a vizsgálatok, amiket elvégeznek a rutinmunka során, nem adnak teljes képet az állat fertilitásáról. A morfológia időigényes és szubjektív eljárás, emellett nincs egy nemzetközileg elfogadott és alkalmazott standard protokoll, így az eredmények nem hasonlíthatók össze egyes kutatások között. Ezen kihívások legyőzésére lehetne alkalmas a sperma morfometria területe, ahol műszerek segítségével, pl. különböző digitális képelemző szoftverrel, mint a kísérletben használt Image-J, vagy egyéb automatizált módszerekkel, pl. ASMA, lehetne a spermium paramétereit mérni, és általuk következtetni a sperma termékenyítőképességére.

A vizsgálataim szignifikáns eltérést mutattak a fejterületek átlagai között, mikor összehasonlítottam a két csoportot, elmondható, hogy a rossz bikáknak kisebb a fejméretük. A fej területének mérete kapcsolatban áll a sejt morfológiájával, illetve a membránintegritásról is szolgáltatathat információt, ezért lehet jelentősége a fertilitás megítélésében. A szórásban nem fedeztem fel különbséget a két csoport között. A kísérlet bebizonyította, hogy a morfometriás spermiumvizsgálat alkalmas lehet a jó és rossz termékenyítő bikák közti különbség felfedezésére. Ennek a gyakorlatban a spermabírálat során lehet jelentősége, ha meghatároznak egy értéktartományt jó, illetve rossz fertilitású spermiumokra, majd ezen értéktartományok alapján gyors morfometriai mérésekkel be tudják sorolni a mintákat egyik vagy másik kategóriába. Az időigényes morfológiai vizsgálat csak szükség esetén, pl. a rossz kategóriába került minták alaposabb vizsgálatánál lenne elvégezve. A mennyiség, koncentráció és motilitás bírálatával kiegészülve a morfometria hasznos adaptációja lehetne a spermaminőség vizsgálatnak.

Mindezek alapján további vizsgálatok javasolhatók a módszer fejlesztésére, pl. a jó és a rossz termékenyítőképesség határértékeinek meghatározása, illetve a méretbeli eltérések okainak felfedése, vagy nagyobb mintán való elvégzése a méréseknek, hogy a kutatás relevanciája bizonyítva legyen. Emellett érdemes lenne vizsgálatok folytatni olyan irányba is, hogy vajon a morfometria képes-e elkülöníteni jó és rossz termékenyítő sperma szubpopulációkat egy mintán belül, pl. ismerten jó és rossz fertilitású termékenyítőadagok összekeverésével és a sejtek megjelölésével. Így bizonyítható lenne a fertilitás hatása a spermiumfejek méreteire illetve a módszer alkalmassága, hogy elkülönítse őket. Ez a továbbiakban a spermaszelekció hatékonyságát is növelné, amiből a kutatás és az ágazat is kamatoztatna és a lehető legjobb minőségű termékenyítőadagok kerülnének a forgalomba.

6. Összefoglalás

A mesterséges termékenyítés dinamikusan fejlődő iparág, amiben nagy szerepe van az idő- és költséghatékony módszereknek. A napjainkban mindenhol fellelhető igény az automatizált, gyors megoldásokra ezen a területen is megjelenik, teret nyernek az olyan műszeres berendezések, mint a flow citometria, vagy a CASA módszer, amik lehetővé teszik a gyors, objektív elbírálását a termékenyítésre kerülő örökítőanyag mintáknak. A tudomány régóta igyekszik a legideálisabb in vitro fertilitási eljárást kidolgozni, ami egy időben a lehető legtöbb tulajdonságot képes sejtszinten vizsgálni.

A megfelelő termékenyítőképességű spermium elengedhetetlen a jó fertilitási arány és a tenyésztés gazdaságossága szempontjából. A szubfertilis ondó komoly anyagi és időbeli veszteségeket tud okozni a visszaivarzás miatt, az újabb termékenyítés szarvasmarha esetén csak 21 nap múlva lehetséges, illetve a szaporulati ráta is csökken, ami bevételkiesést jelent a tenyésztő számára. Éppen ezért az ipar igyekszik a spermiumminőség maximális biztosítására, amihez feltétlenül szükséges a termékenyítőadagok és bikák fertilitásának megfelelő ellenőrzése különböző módszerek által.

Minden tulajdonság, amit egy spermabírálat során ellenőriznek, bizonyítottan összefüggésben van a sperma termékenyítésre való alkalmasságával. Az ejakulátum mennyisége és koncentrációja összefüggő, de nem megegyező paraméterek, míg a mennyiség betekintést nyújt a hím általános fertilitási potenciáljáról és a hígítás mértékéről, addig a koncentráció a termékenyítésre alkalmas sejtek számát adja meg, segít eldönteni, hogy használható-e a minta inszeminálási célokra. A motilitás és a vitalitásvizsgálat egyaránt a sejtek életképességét hivatott megállapítani, a vitalitásvizsgálat általában a sejtmembrán integritását elemezni festési eljárásokkal, míg a motilitás azon egyszerű elv alapján, hogy a mozgó sejtek életben vannak, a holtak pedig mozdulatlanok, dönt a sejtek életképességéről. Ezen kívül figyelembe veszi a mozgás irányát és sebességét is, ugyanis az abnormálisan mozgó sejteknek csökkent esélye van a fertilitásra.

A morfológia szintén fontos szempont, tekintve, hogy a hibás felépítésű sejtek nagy eséllyel nem jutnak el a termékenyítés helyére vagy képtelenek kivitelezni azt és normális embrionális fejlődést indukálni. Azonban a gyakorlatban egyelőre a fénymikroszkópos szubjektív vizsgálatokat alkalmazzák, amiknek amellet, hogy egyszerű eszközöket igényel és olcsó eljárás, számos hátránya van. Nagy tapasztalatot igényel, illetve a sejteket egyenként meg kell vizsgálni, ami lassú folyamat, így az elegendő mennyiségű sejt leszámolása és értékelése is hosszú időt vesz igénybe, arról nem is beszélve, hogy a számos alkalmazott festési és bírálati módszer miatt az eredmények nem egységesek és nehezen hasonlíthatók össze más módszerekkel értékelt kísérleti adatokkal. A bírálat szubjektív, éppen ezért nem is megismételhető.

A sejtek morfológiája befolyással van a fej területének értékeire is, ugyanis egy károsodott spermium membrán feltűnhet a számítógépes képanalízis során nem egységes spermiumfej körvonalként, illetve az alaki defektusok a szoftver által is megjeleníthetnek. De amiben a morfometria előnybe kerül a morfológiával szemben, az az, hogy ezek az elváltozások nem csak vizuálisan megítélhetők, a fejméret területének lemérése által számadatokat kapunk mind a normális, mind a hibás spermiumokról, így vizsgálhatjuk a két kategória közötti különbséget.

A kísérletemben azt vizsgáltam, hogy van –e a bizonyítottan jó és rossz termékenyítőképességű bikák spermium fejterületei között különbség és statisztikailag elkülöníthető a két csoport egymástól a fejméretek alapján. Az eredmények azt mutatták, hogy a rossz bikák esetén az átlagos fejterület szignifikánsan kisebb, tehát el lehet különíteni egymástól a két csoportot az adatok alapján. Ez a jövőben és további kutatások által helyet kaphat a spermavizsgálat rutinjában, mint a fertilitást meghatározó tényező.

A jövőben a mesterséges termékenyítés előreláthatóan rengeteget fog fejlődni, izgalmas potenciált rejtenek magukban a különböző technikai fejlesztések, a mesterséges intelligencia használata és az egyéb asszisztált reprodukciós technológiák területén várható előrehaladás, ami mind élelmezési, mind gyógyászati, mind egyéb nyersanyagelőállítási szempontból rendkívül fontos tényező.

Irodalomjegyzék:

- AL-MAKHAZOOMI A, LUNDEHEIM N, HÄÄRD M, RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ H. (2008): ***Sperm morphology and fertility of progeny-tested AI dairy bulls in Sweden.*** Theriogenology. 2008 Sep 1;70(4):682-91.
- BARTH A. D. (2018): ***Review: The use of bull breeding soundness evaluation to identify subfertile and infertile bulls,*** Animal. 2018 Jun;12(s1):s158-s164
- BARTH, A.D. and OKO, R.J. (1989): ***Abnormal Morphology of Bovine Spermatozoa.*** Iowa State University Press, Ames.
- BECZE J. (1983): ***A hímivarú állatok szaporodásbiológiája,*** Mezőgazdasági kiadó, Budapest, pp. 25-33, pp. 129-134
- BOLLWEIN H, MALAMA E., (2023): ***Review: Evaluation of bull fertility, Functional and molecular approaches,*** Animal. 2023 May;17 Suppl 1:100795.
- CHIECO P, DERENZINI M. (1999): ***The Feulgen reaction 75 years on,*** Histochem Cell Biol. 1999 May;111(5):345-58
- ENCISO M, CISALE H, JOHNSTON SD, SARASA J, FERNÁNDEZ JL, GOSÁLVEZ J. (2011): ***Major morphological sperm abnormalities in the bull are related to sperm DNA damage,*** Theriogenology. 2011 Jul 1;76(1):23-32.
- GERE T. – SOÓS P. – SZÁSZ F. (1998): ***A szarvasmarha mesterséges termékenyítése,*** Mezőgazda kiadó, Budapest, pp. 7-18, 37-35, 67-87.
- GORDON, I. (2004): ***Reproductive technologies in farm animals,*** Oxford University Press, Oxford, pp. 49-75
- HARASZTI J. - ZÖLDÁG L. (1993): ***A háziállatok szülészete és szaporodásbiológiája,*** Mezőgazda kiadó, Budapest, pp. 692-729.
- HENAULT MA, KILLIAN GJ. (1995): ***Effects of sperm preparation and bull fertility on in vitro penetration of zona-free bovine oocytes,*** Theriogenology. 1995 Mar;43(4):739-49.
- MOCÉ E, GRAHAM JK. (2008): ***In vitro evaluation of sperm quality,*** Animal Reproduction Science, 2008 Apr;105(1-2):104-18
- NAGY S, JOHANNISSON A, WAHLSTEN T, IJÄS R, ANDERSSON M, RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ H. (2013): ***Sperm chromatin structure and sperm morphology: their association with fertility in AI-dairy Ayrshire sires.*** Theriogenology. 2013 May;79(8):1153-61.
- NAGY, S., KOVACS, B., JOHANNISSON, A. (2023): ***Evaluation of domestic animal sperm head morphology via flow cytometric DNA labelling and pulse shape analysis using bull and stallion spermatozoa as model species.*** Reproduction in Domestic Animals, 00, 1–7
- PÉCSI T. (2007): ***Házi emlősállatok mesterséges termékenyítése,*** Mezőgazda kiadó, Budapest, pp. 9-11, 81-114
- RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ H. (2007): ***State of the art in farm animal sperm evaluation.*** Reprod Fertil Dev. 2007;19(1):91-101.
- SAACKER RG (2008): ***Sperm morphology: Its relevance to compensable and uncompensable traits in semen,*** Theriogenology. 2008 Aug;70(3):473-8.
- STAUB C., JOHNSON L. (2018):, ***Review: Spermatogenesis in the bull,*** Animal, Volume 12, Supplement 1, 2018, Pages s27-s35, ISSN 1751-7311

- ZUIDEMA D., KERNS K., SUTOVSKY P. (2021): ***An Exploration of Current and Perspective Semen Analysis and Sperm Selection for Livestock Artificial Insemination.*** Animals. 2021; 11(12):3563.

Köszönetnyilvánítás

Szeretnék köszönetet mondani konzulensemnek, **Dr. Nagy Szabolcs Tamásnak** a munkám során nyújtott segítségéért és a hasznos tanácsokért.

Budapest, 2023.

NYILATKOZAT

a szakdolgozat nyilvános hozzáféréséről és eredetiségéről

A hallgató neve: Major Emma

A Hallgató Neptun kódja: T48G88

A dolgozat címe: Mesterséges termékenyítésre használt bikasperma morfometriai értékelése

A megjelenés éve: 2023

A konzulens intézetének neve: Állattenyésztési Tudományok Intézet

A konzulens tanszékének a neve: Precíziós Állattenyésztési és Állattenyésztési Biotechnika Tanszék

Kijelentem, hogy az általam benyújtott szakdolgozat egyéni, eredeti jellegű, saját szellemi alkotásom. Azon részeket, melyeket más szerzők munkájából vettem át, egyértelműen megjelöltem, és az irodalomjegyzékben szerepeltettem.

Ha a fenti nyilatkozattal valótlant állítottam, tudomásul veszem, hogy a záróvizsgabizottság a záróvizsgából kizár és a záróvizsgát csak új dolgozat készítése után tehetnek.

A leadott dolgozat, mely PDF dokumentum, szerkesztését nem, megtekintését és nyomtatását engedélyezem.

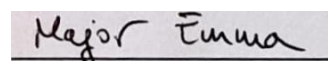
Tudomásul veszem, hogy az általam készített dolgozatra, mint szellemi alkotás felhasználására, hasznosítására a Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem mindenkor szellemitulajdon-kezelési szabályzatában megfogalmazottak érvényesek.

Tudomásul veszem, hogy dolgozatom elektronikus változata feltöltésre kerül a Magyar Agrár és Élettudományi Egyetem könyvtári repozitori rendszerébe. Tudomásul veszem, hogy a megvédett és

- nem titkosított dolgozat a védést követően

- titkosításra engedélyezett dolgozat a benyújtásától számított 5 év eltelte után nyilvánosan elérhető és kereshető lesz az Egyetem könyvtári repozitori rendszerében.

Kelt: Budapest, 2023. 11. 04.



Hallgató aláírás

NYILATKOZAT

Major Emma (hallgató Neptun azonosítója: T48G88) konzulenseként nyilatkozom arról, hogy a szakdolgozatot áttekintettem, a hallgatót az irodalmi források korrekt kezelésének követelményeiről, jogi és etikai szabályairól tájékoztattam.

A szakdolgozatot a záróvizsgán történő védeésre javaslom / nem javaslom¹.

A dolgozat állam- vagy szolgálati titkot tartalmaz: igen nem^{*2}

Kelt: 2023 év november hó 04 nap



Dr. Nagy Szabolcs Tamás

belső konzulens

¹ A megfelelő aláhúzendó.

² A megfelelő aláhúzendó.