

A kossperma eltarthatósága zselatinos hígítóban

Budai Csilla¹ – Egerszegi István² – Rátky József² – Kovács András¹

¹Debreceni Egyetem Agrár- és Gazdálkodástudományok Centruma, Mezőgazdaság-, Élelmiszertudományi és Környezetgazdálkodási Kar Állattudományi, Biotechnológiai és Természetvédelmi Intézet, Debrecen

²Állattenyésztési és Takarmányozási Kutatóintézet, Herceghalom csilla.budai87@gmail.com

ÖSSZEFOGLALÁS

A kutatás célja az volt, hogy megállapítsuk, a zselatin tartalmú hígító miként befolyásolja az öt napon át, 5 °C-on tárolt kosspermiumok életképességét. A hipotézisünk az volt, hogy ha zselatint adunk a spermahígítókhoz, akkor az ötnapos tárolás során a spermiumok tovább megőrzik életképességüket, mint a kontroll hígítóban. A kutatáshoz két alaphígítót használtunk. Az egyik 1,5%-os zsírtartalmú UHT-tej, a másik 1,5%-os zsírtartalmú UHT-tej + 5% tojássárgája. Mind a két hígítóhoz 0; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0%-ban adtunk Dr. Oetker lapzselatint.

A hígított ejakulátumokat 5 napig +5 °C-on tároltuk és 24 óránként mintát vettünk belőlük. A mintákból Kovács-Foote-féle festéssel készítettünk keneteket, amiket fénymikroszkóp segítségével értékeltünk ki. A sejteket öt csoportba soroltuk úgy, mint: élő-ép, élő-sérült akroszómájú, elhalt, élő fejtű-elhalt farkú, élő farkú-elhalt fejtű. Varianciaanalízis segítségével határoztuk meg, hogy van-e összefüggés a zselatin koncentráció és a spermiumok életképessége, morfológiája között. Az eredmények alapján arra a következtetésre jutottunk, hogy az élő ép sejtek aránya tendenciájában az 1,5%-os zsírtartalmú UHT tej + 1% zselatin, illetve 1,5%-os zsírtartalmú UHT-tej + 5% tojássárgája + 1,5% zselatin összetételű hígítók esetében volt a legnagyobb, de az eltérések nem voltak szignifikánsak ($p > 0,05$).

Kulcsszavak: zselatin, sperma, folyékony tárolás 5 °C-on, UHT tejes hígító

SUMMARY

The aim of our study was to examine how different gelatin concentrations affect ram semen viability in liquid storage at 5 °C for five days. Our hypothesis was if we add gelatin to the semen extender, than the viability of ram semen will be better in the extenders containing gelatin, than the control. We used two different semen extenders: 1.5% UHT milk and 1.5% UHT milk + 5% egg yolk. We added 0; 0.5; 1.0; 1.5; 2.0% Dr. Oetker gelatin to the semen extenders. We stored the semen for five days at 5 °C and in every 24 hour we made sampling.

We stained the smears with Kovács-Foote staining and evaluated them with light-microscope. We categorized the cells in five groups like: live and intact cells, live cells with injured acrosome, dead cells, live head with dead tail and live tail with dead head. We used one-way analysis of variance (ANOVA) to assign how gelatin concentration affects the number of the categorized cells. On the fifth day, the viability was the best in the following semen extenders: 1.5% fat UHT milk + 1.0% gelatin and 1.5% fat UHT milk + 1.5% gelatin, but it was not significant ($p > 0.05$).

Keywords: gelatin, semen, liquid storage at 5 °C, UHT milk extender

BEVEZETÉS

Az akroszóma és akroszómareakció közvetlenül befolyásolja a spermium termékenyítő képességét (Sarlós, 1999; Szász, 2007). A spermiumok hidegsokk és fagyasztás hatására képesek elveszteni akroszómájukat, a leválás mértéke viszont védőanyagok (antioxidánsok, zselatinok) hozzáadásával csökkenthető (Torre et al., 2007). A spermiumok konzerválásához felhasznált hígító összetétele döntően befolyásolja a motilis, akroszómával rendelkező sejtek számát. Salamon és Maxwell (2000) szerint a tej azért jó spermahígító, mert a benne található fehérjék pufferként viselkednek, így tárolás során a pH és a hőmérséklet ingadozását képesek tompítani. Az UHT (ultramagas hőmérsékleten kezelt tej) tej előnye a nyerstejjel szemben, hogy hígítás előtt nem kell forralni és azonnal felhasználható, valamint steril tápközeget biztosít a spermiumok számára.

A szintetikus zselatint tartalmazó spermahígítót már több állatfaj esetében alkalmazták a sperma konzerválásához. Nagy et al. (2002) nyúlsperma hígítóhoz adtak zselatint, majd 72 órán át +5 °C-on tartották a termékenyítőanyagot. Kontrollként zselatinmentes hígítót használtak. A vizsgálat végén azt az eredményt kapták, hogy a zselatint tartalmazó hígítóban volt több az élő, akroszómával rendelkező sejtek száma. Yáñez et al. (2005) kossperma hűtve tárolásához használtak zselatint. A kontrollként használt hígító UHT-tej volt. A spermát 2, 24, 48 óráig tárolták +15 °C-on. A 24 és 48 óras tárolást követően a zselatinos hígítóban volt magasabb a motilis sejtek aránya. A 24 órát tárolt spermamintákat peteburok kötődési teszt segítségével is értékelték. A peteburok kötődési teszt lényege, hogy a zona pellucidához szorosan kapcsolódó spermiumok száma összefüggésben van a sperma in vivo termékenyítő képességével. A minták értékelésénél azt az eredményt kapták, hogy a zselatinos hígítóban tárolt hímivarsejtek nagyobb arányban kötődtek, mint a kontroll hígítóban tárolt spermiumok. Salvador et al. (2006) kecske spermát tároltak tejben (M) – ami egyben kontroll hígító is volt –, amihez zselatint (G), ciszteint (C), zselatint+ciszteint (GC) adtak. A termékenyítő anyagot hígítást követően 72 órát +5 °C-on tárolták. A kísérletben vizsgálták a spermiumok motilitását és termékenyítő képességét. Eredményeik alapján a zselatinos közegben tárolt spermiumok tovább megőrizték motilitásukat, mint a kontroll hígítóban tárolt sejtek, de a fertilitásban nem tapasztaltak szignifikáns különbséget. Paulenz et al. (2010) az volt a hipotézise, hogy ha tejes hígítóhoz zselatint adnak, a kosspermiumok tovább maradnak életben. Kísérletükben 15 kos spermáját hígí-

tották meg tejjel, majd 0,2 ml-es műszalmában 12 óráig és 24 óráig tárolták a termékenyítőanyagot. A tejjel hígított ejakulátum egy részéhez zselatint adtak, amit 0,5 ml-es műszalmába szívtak fel és szintén 12 óráig és 24 óráig tárolták az ondót.

A hígított ejakulátumokkal 633 anyajuhot termékenyítettek. A spermiumok termékenyítő képességét az ellési eredmények alapján értékelték. Az ellési százalék nem mutatott szignifikáns összefüggést a tárolás ideje és a hígítóban lévő zselatin mennyisége között.

ANYAG ÉS MÓDSZER

A vizsgálatokhoz a Debreceni Egyetem Kismacsi Kísérleti Telepén elhelyezett cigája fajtájú kosok ejakulátumait használtuk fel. Az ugratásra főszezonban, november 7-én került sor. A spermavétel műhüvellyel történt. Ezt követően először az ejakulátum mennyiségét ml-ben mértük meg, a duplafalú spermavételi poháron lévő skála segítségével. A mennyiség leolvasása után az élősejtszám százalékos arányát OLYMPUS BX64 fénymikroszkóp segítségével határoztuk meg, 400×-os nagyítás mellett a Evans és Maxwell (1987) által leírt módszer segítségével. Az ejakulátum sűrűségét Minitube Photometer SDM5 fotometriás sűrűségmérő segítségével határoztuk meg. A mintákat 5–5 egyenlő részre osztottuk, majd 37 °C-os vízfürdőbe helyeztük a hidegsokk elkerülése érdekében. Az ondó hígítása a koncentráció függvényében történt. A hígítást akkor végeztük, amikor az ejakulátum és a hígítók is 30 °C-ra hűltek le a vízfürdőben. A cervikális inszeminálásnál alkalmazott hígított spermában 120×10^6 az élő sejtek száma (Evans és Maxwell, 1987). Mi is ugyanezt a hígítást alkalmaztuk. Két hígítót használtunk. Az egyik 1,5%-os zsírtartalmú UHT-tej, a másik 1,5%-os zsírtartalmú UHT-tej + 5% tojássárgája. Mindkét hígítóhoz 0; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0%-ban adtunk Dr. Oetker lapzselatint.

A zselatint nem tartalmazó hígított mintákat használtuk kontrollként. Hígítást követően az ondót fokozatosan hűtöttük le +5 °C-ra, majd öt napon át ezen a hőmérsékleten tároltuk. A hígított ejakulátumból 24 óránként mintát vettünk, és elvégeztük az élő-elhalt és akroszóma festést (Kovács és Foote, 1992; Nagy et al., 1999; Kútvölgyi et al., 2006). A spermamintákat PBS (0,82% NaCl + 0,06% K_2HPO_4 anhidrát) + 0,1% formalin oldattal hígítottuk 100×-os mértékben, majd egy cseppet tárgylemezen elkevertünk egy csepp Chicago Sky Blue (0,16%) festékoldattal, amely az élő és holt ondósejtek elkülönítésére alkalmas festék. Egy másik tárgylemez segítségével kenetet készítettünk, majd levegőn közel függőleges helyzetben szárítottuk. Száradást követően a mintákat 4 percre fixáló oldatba (86 ml 1N HCl, 14 ml 37%-os formaldehid oldat, 0,2 g neutrál-vörös, Sigma N 2880) helyeztük. A fixált keneteket folyó csapvízzel, majd desztillált vízzel öblítettük. Ezt követően az akroszóma festésre használt Giemsa oldatban (50 ml desztillált víz + 4 ml Giemsa 7,5%-os törzsoldat, Sigma GS 500) 38 °C-on, 4 órán keresztül tartottuk a keneteket, majd folyó csapvízzel és desztillált vízzel öblítettük. A már megszáradt keneteket xilolban oldott 1%-os vajsárga (dimethyl yellow, Sigma D6760) és kanadabalzsam (Canada Balsam, Sigma C1795) 3:1 arányú keverékéből álló oldattal fedtük le.

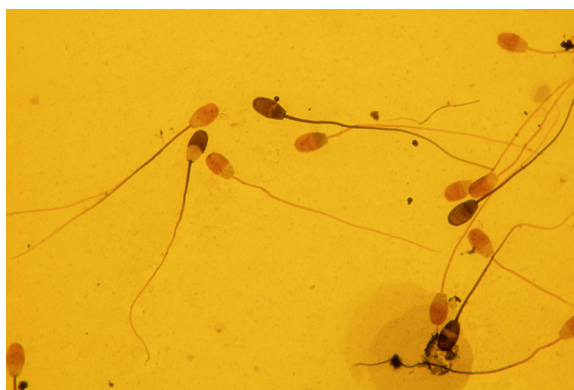
A keneteket 400×-os nagyítással, OLYMPUS BX64 fénymikroszkóp segítségével értékeltük. Az értékelést a tárgylemez több pontján is elvégeztük, lemezenként 200 spermiumot az alábbi csoportokba soroltunk:

1. Élő, ép sejtek.
2. Élő, sérült akroszómával rendelkező sejtek.
3. Elhalt sejtek (fej + farok).
4. Élő fej, elhalt farok.
5. Elhalt farok, élő fej.

A különböző csoportok elkülönítéséhez a Nagy et al. (1999) által leírt módszert használtuk. Az élő és elhalt sejtek megítéléséhez a fej hátulsó, az akroszóma épségéről annak elülső része nyújt tájékoztatást (*1. kép*). Az általunk meghatározott morfológiai kategóriák és a zselatin koncentráció közötti kölcsönhatást egytényezős varianciaanalízissel (ANOVA) határoztuk meg SPSS for Windows 13.0 program segítségével.

FEJ:	élő→fehér színű elhalt→fekete (szürke) színű
FAROK:	élő→rózsaszínű elhalt→sötét lila, fekete színű
AKROSZÓMA:	ép→bíbor színű + egyenes alapvonal fállazult→sötét levendula színű + ívelt alapvonal sérült→világos levendula színű hiányzó→fehér színű fej és azon a piros posztakroszomális gyűrű

1. kép: Kosspermiumok értékelése Kovács-Foote-féle festéssel



Picture 1: Ram semen evaluation with Kovács-Foote staining

EREDMÉNYEK ÉS KÖVETKEZTETÉSEK

A 1,5%-os zsírtartalmú UHT-tej + zselatin tartalmú hígítók közül az 1% zselatint tartalmazóban volt a legtöbb élő, ép spermium az ötödik napon (*1. ábra*). Az eredmények alapján arra a következtetésre jutottunk, hogy tejes hígítóban, öt napon át +5 °C-on tárolt spermiumok az 1% zselatin tartalmú hígítóban maradnak legtovább életben, de ez nem szignifikáns ($p > 0,05$).

A 1,5%-os zsírtartalmú UHT-tej + 5% tojássárgáját is tartalmazó hígítók közül a 1,5% zselatint tartalmazó hígítóban volt a legmagasabb az élő, ép spermium aránya az ötödik napon (*2. ábra*). A 2% zselatint tartalmazó hígítóban az ötödik napon már nem találtunk élő, ép sejteket. A különböző zselatin koncentrációk és az élő sejtek százaléka között nem mutatható ki szignifikáns különbség ($p > 0,05$).

1. ábra: A 1,5%-os zsírtartalmú UHT-tej + zselatin tartalmú hígítókban az élő, ép sejtek %-os aránya az ötnapos tárolás során

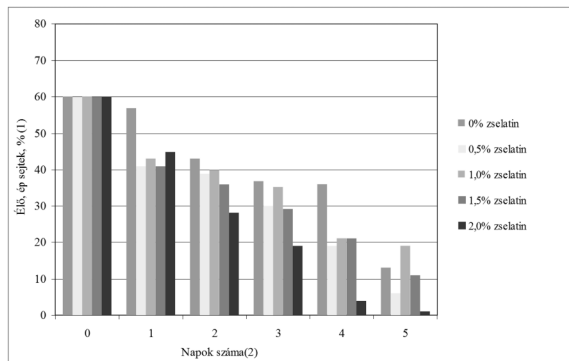


Figure 1: The percentage of live, intact cells in 1.5% UHT milk + gelatin during five days of storage
Live, intact cells (%) (1), Number of days (2)

2. ábra: A 1,5%-os zsírtartalmú UHT-tej + 5% tojássárgája + zselatin tartalmú hígítókban az élő, ép sejtek %-os aránya az ötnapos tárolás során

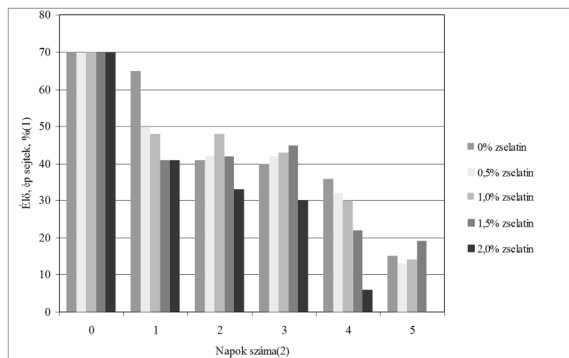


Figure 2: The percentage of live, intact cells in 1.5% UHT milk + 5% egg yolk + gelatin during five days of storage
Live, intact cells (%) (1), Number of days (2)

A 3. ábra adatai alapján látható, hogy a 2,0%-os zselatin tartalmú hígítóban volt a legmagasabb az elhalt sejtek aránya az ötödik napon. A legkevesebb elhalt sejt az 1,0%-os zselatint tartalmazó hígítóban volt. Az elhalt sejtek aránya és a zselatin koncentrációja között nincs szignifikáns összefüggés ($p > 0,05$).

Az 1,5%-os zsírtartalmú UHT-tej + 5% tojássárgája + zselatin tartalmú hígítókban szintén a 2,0%-os zselatin tartalom mellett volt a legtöbb az elhalt sejtek száma, a legkevesebb az 1,5%-os zselatin tartalmú hígítóban volt az ötödik napon. A zselatin koncentráció és az elhalt sejtek száma között nincs szignifikáns összefüggés ($p > 0,05$) (4. ábra).

Az ötnapos tárolás alatt az 1,5% zselatint tartalmazó mintában volt a legtöbb élő fejtű, elhalt farkú sejt, míg a legkevesebb a 2,0%-os zselatint tartalmazó mintában volt (5. ábra). A zselatin koncentrációja nem volt hatásos az élő fejtű, elhalt farkú sejtek számára ($p > 0,05$).

A tojássárgáját is tartalmazó ejakulátumban a 1,5% zselatint tartalmazó mintákban fordult elő a legtöbb élő fejtű, elhalt farkú sejt. A legkevesebb sejt ebben az esetben is a 2% zselatintartalmú ejakulátumban volt (6. ábra).

3. ábra: A 1,5%-os zsírtartalmú UHT-tej hígítókban az elhalt sejtek %-os aránya az ötnapos tárolás során

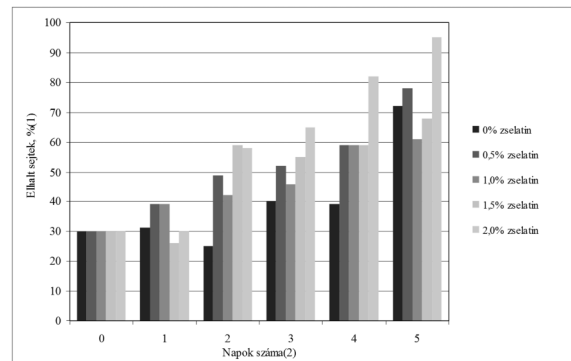


Figure 3: The percentage of dead cells in 1.5% UHT milk + gelatin during five days of storage
Dead cells (%) (1), Number of days (2)

4. ábra: A 1,5%-os zsírtartalmú UHT-tej + 5% tojássárgája + zselatin tartalmú hígítókban az elhalt sejtek %-os aránya az ötnapos tárolás során

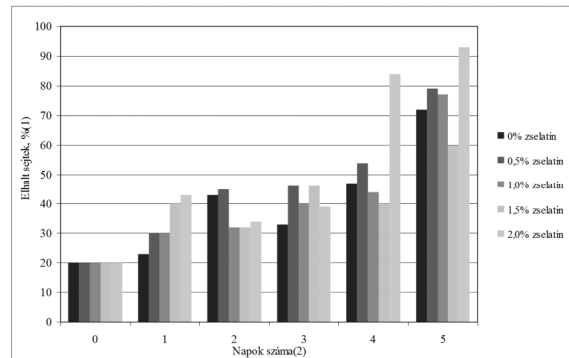


Figure 4: The percentage of dead cells in 1.5% UHT milk + 5% egg yolk + gelatin during five days of storage
Dead cells (%) (1), Number of days (2)

5. ábra: A 1,5%-os zsírtartalmú UHT-tej + zselatin tartalmú hígítókban az élő fejtű, elhalt farkú sejtek %-os aránya az ötnapos tárolás során

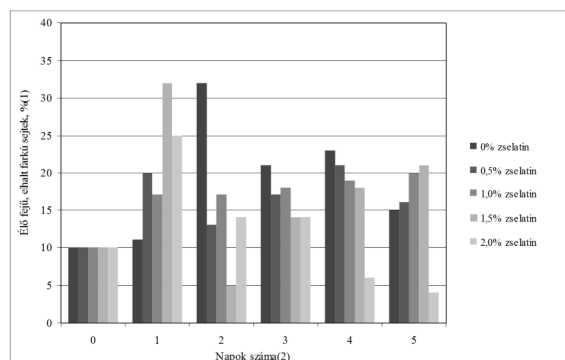


Figure 5: The percentage of live headed, dead tailed cells in 1.5% UHT milk + gelatin during five days of storage
Live headed, dead tailed cells (%) (1), Number of days (2)

6. ábra: A 1,5%-os zsírtartalmú UHT-tej + 5% tojássárgája + zselatin tartalmú hígítókban az élő fejű, elhalt farkú sejtek %-os aránya az ötnapos tárolás során

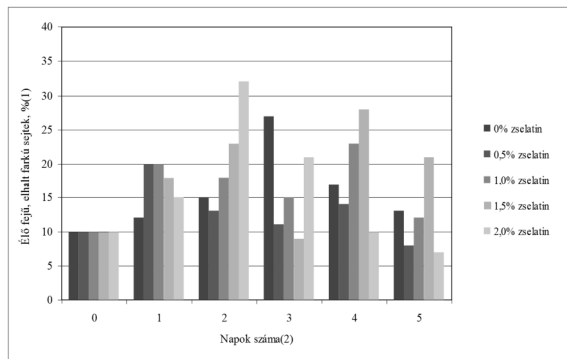


Figure 6: The percentage of live headed, dead tailed cells in 1.5% UHT milk + 5% egg yolk + gelatin during five days of storage. Live headed, dead tailed cells (%)(1), Number of days(2)

A zselatin koncentráció és az élő fejű, elhalt farkú sejtek száma között nincs szignifikáns különbség ($p > 0,05$).

A vizsgált mintákban élő farkú-elhalt fejű, illetve élő-sérült akroszómával rendelkező sejt olyan kis számban fordult elő, hogy erre a két kategóriára nem végeztük el a szignifikancia vizsgálatot.

Az eredmények alapján az öt napig tartó, +5 °C-on végzett tárolás során az 1,0–1,5% zselatint tartalmazó tejes és tej + tojássárgájás hígítókban a kossperma minták élő, ép sejtjeinek aránya megfelelő volt.

KÖSZÖNETNYÍLVÁNÍTÁS

A publikáció elkészítését a TÁMOP 4.2.1./B-09/1/KONV-2010-0007 és a TÁMOP-4.2.2/B-10/1-2010-0024 számú projektek támogatták. A projekt az Európai Unió támogatásával, az Európai Szociális Alap társfinanszírozásával valósult meg.

IRODALOM

- Evans, G.–Maxwell, W.M.C. (1987): Salamon's Artificial Insemination of Sheep and Goat. Butterworths. Sydney. 200.
- Kovács, A.–Foote, R.H. (1992): Viability and acrosome staining of bull, boar and rabbit spermatozoa. *Biotech and Histochem.* 67: 119–124.
- Kútvölgyi, G.–Stefler, J.–Kovács, A. (2006): Viability and acrosome staining of stallion spermatozoa by Chicago sky blue and Giemsa. *Biotech and Histochem.* 81: 109–117.
- Nagy, Sz.–Házás, G.–Bali-Papp, Á.–Iváncsics, J.–Szász, F.–Kovács, A.–Foote, R.H. (1999): Evaluation of sperm tail membrane integrity by light microscopy. *Theriogenology.* 52: 1153–1159.
- Nagy, Sz.–Sinkovics, Gy.–Kovács, A. (2002): Viability and acrosome integrity of rabbit spermatozoa processed in a gelatin-supplemented extender. *Anim. Reprod. Sci.* 7: 283–286.
- Paulenz, H.–Ådnøy, T.–Fossen, O.H.–Söderquist, L. (2010): Effect on field fertility of addition of gelatine, different dilution rates and storage times of cooled ram semen after vaginal insemination. *Reproduction in Domestic Animals.* 45. 4: 706–710.
- Salamon, S.–Maxwell, W.M.C. (2000): Storage of ram semen. *Anim. Reprod. Sci.* 62: 77–111.
- Salvador, I.–Yániz, J.–Viudes-de-Castro, M.P.–Gómez, E.A.–Silvestre, M.A. (2006): Effect of solid storage on caprine semen conservation at 5 °C. *Theriogenology.* 66: 974–981.
- Sarlós P. (1999): A sertés ivari működése. ÁTK Kiadvány. Herceghalom.
- Szász F. (2007): Az ondó vizsgálata. [In: Pécsi T. (szerk.) Házi emlősállatok mesterséges termékenyítése.] Mezőgazda Kiadó. Budapest. 95–104.
- Torre, M.L.–Faustini, M.–Attilio, K.M.E.–Vigo, D. (2007): Cell encapsulation in mammal reproduction. *Recent Patents on Drug Delivery & Formulation.* 1: 81–85.
- Yániz, J.–Martí, J.I.–Silvestre, M.A.–Folch, J.–Santolaria, P.–Alabart, J.L.–López-Gatius, F. (2005): Effects of solid storage of sheep spermatozoa at 15 °C on their survival and penetrating capacity. *Theriogenology.* 64: 1844–1851.