

Szent István Egyetem

Állatorvos-tudományi Doktori Iskola

**A stresszkezelés hatásának vizsgálata a sertésondó
mélyfagyasztási protokolljában és az így kezelt
mélyfagyasztott ondó gyakorlati alkalmazásának eredményei**

PhD értekezés

Dr. Horváth András

2015

Szent István Egyetem
Állatorvos-tudományi Doktori iskola

Témavezető és témabizottsági tagok:

.....
Prof. Dr. Szenci Ottó témavezető
egyetemi tanár, az MTA doktora
Szent István Egyetem, Állatorvos-tudományi Kar
Haszonállat-gyógyászati Tanszék és Klinika

.....
Dr. Pribenszky Csaba
tudományos főmunkatárs, PhD
Szent István Egyetem, Állatorvos-tudományi Kar
Állattenyésztési, Takarmányozástani és Laborállat-tudományi Intézet,
Állattenyésztési és Genetikai Osztály

Készült 8 példányban. Ez a 2. sz. példány.

.....
Dr. Horváth András

Tartalomjegyzék

| | |
|---|----|
| 1. Összefoglalás | 7 |
| 2. Bevezetés | 10 |
| 3. Irodalmi áttekintés..... | 12 |
| 3.1. A mélyfagyasztás hatása a sertés hímivarsejtjeire | 12 |
| 3.1.1. <i>Fizikai és kémiai változások</i> | 12 |
| 3.1.2. <i>Szabad gyökök és a redox rendszerek</i> | 13 |
| 3.1.3. <i>Sejtmembrán</i> | 14 |
| 3.1.4. <i>Kriokapacitáció</i> | 14 |
| 3.1.5. <i>DNS</i> | 15 |
| 3.1.6. <i>Sokkfehérjék</i> | 16 |
| 3.1.7. <i>Ondóplazma</i> | 17 |
| 3.2. A sertésondó mélyfagyasztásának eredményességét javító hatások | 19 |
| 3.3. A stressz és a hidrosztatikai nyomás (HP) kapcsolata..... | 25 |
| 4. Anyag és módszer | 26 |
| 4.1. Állatok | 26 |
| 4.2. Mélyfagyasztás..... | 27 |
| 4.3. Kísérleti elrendezések | 28 |
| 4.4. In vitro vizsgálatok..... | 31 |
| 4.4.1. <i>Mozgás vizsgálata</i> | 31 |
| 4.4.2. <i>Sejtmembránok vizsgálata</i> | 31 |
| 4.5. Mesterséges termékenyítés..... | 32 |
| 4.6. Vemhességi vizsgálat és adatgyűjtés | 33 |
| 4.7. Statisztika..... | 33 |
| 5. Eredmények..... | 34 |

| | |
|--|----|
| 5.1. In vitro kísérletek | 34 |
| 5.1.1. A HP kezelések hatása | 34 |
| 5.1.2. A HP kezelés optimalizálása | 40 |
| 5.2. In vivo kísérletek..... | 40 |
| 5.2.1. Mélyfagyasztások eredményessége és felhasználása | 40 |
| 5.2.2. Szaporodásbiológiai (in vivo) eredmények..... | 41 |
| 5.3. In vitro és az in vivo eredmények közötti kapcsolat | 43 |
| 6. Megbeszélés..... | 43 |
| 7. Új tudományos eredmények | 50 |
| 8. Felhasznált irodalom..... | 51 |
| 9. A témában megjelent tudományos közlemények | 61 |
| 10. Köszönetnyilvánítás | 64 |

Rövidítések jegyzéke

| | | |
|-------------------------------|----------------------------------|--|
| AI | artificial insemination | mesterséges termékenyítés |
| AOC | average orientation change | spermiumok átlagos elmozdulásának értéke |
| ATM | atmospheric pressure | atmoszférikus (légköri) nyomás |
| | (in vitro control) | (in vitro kontroll) |
| ATP | adenosine triphosphate | adenozin-trifoszfát |
| BT | body temperature | testhőmérséklet |
| Ca ²⁺ | calcium ion | kalcium ion |
| CASA | computer assisted | számítógép vezérelt |
| | sperm analyzer | spermaelemző szoftver |
| C-FT | control frozen-thawed semen | kontroll mélyfagyasztott ondó |
| Cl ⁻ | chlorid-ion | klorid ion |
| CAI | cervical artificial insemination | cervikális mesterséges termékenyítés |
| DNS | deoxyribonucleic acid | dezoxiribonukleinsav |
| DSL | distance straight line | egyenes mozgási útvonal távolsága |
| DUI | deep intrauterine insemination | mély intrauterin termékenyítés |
| eCG | equine chorionic gonadotropin | ló chorion gonadotropin |
| Ext | extender | hígító |
| FS | fresh semen | friss ondó |
| FT | frozen-thawed semen | mélyfagyasztott ondó |
| hCG | human chorionic gonadotropin | humán chorion gonadotropin |
| HCO ₃ ⁻ | hydrogen carbonate | hidrogén-karbonát ion |

| | | |
|-----------------|---|--|
| HP | hydrostatic pressure treatment | hidrosztatikai nyomáskezelés |
| HP-FT | hydrostatic pressurized frozen-thawed semen (in vivo control) | hidrosztatikai nyomással stresszkezelt mélyfagyasztott ondó (in vivo kontroll) |
| HSP | heat shock protein | hő sokk fehérje |
| LN ₂ | liqued nitrogen | folyékony nitrogén |
| Na ⁺ | sodium ion | nátrium ion |
| n.a. | non available | nem elérhető |
| OR | odds ratio | esélyhányados |
| P1 | first 10-15 ml of the sperm-rich fraction | spermában gazdag frakció első 10-15 ml-e |
| P2 | post sperm-rich fraction | spermában gazdag frakció utáni frakció |
| PM% | percentage of progressive motility | progresszíven mozgó spermiumok aránya |
| PR | programmable deep-freezer | programozható mélyfagyasztó |
| RT | room temperature | szobahőmérséklet |
| S.D. | standard deviation | szórás |
| S.E. | standard error | standard hiba |
| Sp. | spermatozoa | hímivarsejt |
| TM% | percentage of total motility | összes mozgó spermiumok aránya |
| UI | intrauterine insemination | termékenyítés a méhtestbe |

1. Összefoglalás

Kísérleteink célja az volt, hogy a sertés spermiumok mélyfagyasztásában a különböző nagyságú (20/40/80MPa) és különböző ideig ható (40/80/120 perc) hidrosztatikai nyomás (HP) által kiváltott stressz hatását vizsgáljuk a sertés spermiumok in vitro paramétereire és telepi körülmények között (cervikális termékenyítéssel hormonális szinkronizáció nélkül) a szaporodásbiológiai eredményekre. Feltételeztük, hogy a HP alkalmazásával a sertés spermiumok ellenállóképessége a mélyfagyasztás károsító hatásával szemben növelhető, ami jobb termékenyítő képességet eredményez.

Az első in vitro kísérletünkben információt kaptunk arról, hogy az ondóvételt követő hígítás után (Ext.I.) szobahőmérsékleten (RT) végzett egyszeri 80MPa kezelés – függetlenül a nyomás idejétől – vagy a légköri nyomáson (ATM, kontroll) való tárolás RT-n már a mélyfagyasztást megelőzően szignifikánsan rontó hatással bír az összes mozgó spermiumok (TM%, $P < 0,001$) és/vagy a progresszíven mozgó spermiumok (PM%, $P < 0,05$) arányára, amíg ezt az azonos körülmények között elvégzett a 20 és a 40MPa kezelés képes volt kivédeni. A mélyfagyasztás utáni TM% és PM%-ra – a nyomás nagysága mellett – már a nyomás időtartama is hatással volt ($P < 0,05$). A legnagyobb TM% értékeket a 40MPa:120 perc kezeléssel értük el, de a legnagyobb mértékű javító hatás – a kontroll ATM mintákhoz képest – a 40MPa:80 perc kezelést követően jelentkezett. Hasonló eredményt kaptunk a PM% esetében is, de a 40MPa:80 perc kezelés javító hatásának mértéke szignifikánsan nem ($P > 0,05$) különbözött a 40MPa:120 perc kombinációtól. Eredményeinkből megállapíthattuk, hogy az ondókezelés során a spermiumok dinamikus rendszerként “viselkednek” a rájuk ható HP kezeléssel szemben és a tapasztalati úton felállított nyomás: idő mátrix kísérleti kombinációkból a legideálisabb javító hatás a 40MPa:80 perc HP kezeléstől várható.

A második in vitro kísérletünkben azt vizsgáltuk, hogy 40MPa:80 perc kezeléssel tovább lehet-e optimalizálni RT-n a mélyfagyasztási protokollt úgy, hogy a HP-t egy alkalommal a mélyfagyasztás különböző lépéseiben alkalmazzuk: HP1: ondóvételt követő hígítás (Ext.I.) után testhőmérsékleten (BT), HP2: ondóvételt követő hígítás (Ext.I.) után RT-n, HP3: a centrifugálást követő visszahígítás (Ext.II.) után RT-n és HP4: a mélyfagyasztásos hígítóval való hígítás (Ext.III.) után RT-n. A HP2-vel és a HP3-mal lehetett a legnagyobb TM%-ot és az ATM csoporthoz képest szignifikáns növekedést ($P < 0,05$) elérni. A többi HP kezelési mód és az ATM minták in vitro paramétereire között (TM%, PM%, akroszóma-, fej- és farokmembrán) egyik esetben sem tudtunk szignifikáns különbséget ($P > 0,05$) megfigyelni. A HP3 kezelés több szempontból is előnyösebbnek bizonyult a HP2 kezeléshez képest. Egyrészt a legnagyobb

mértékű javító hatással rendelkezett a TM%-ban az egyéb HP kezelésekkel szemben, másrészt az Ext.II. higitás utáni kisebb térfogat (10-15 ml) jelentősen megkönnyítette az ondóminták HP kezelését. Ezzel igazoltuk, hogy a HP kezelés alkalmazásának a helye további hatással van a mélyfagyasztás utáni TM%-ra és az RT-n elvégzett HP3 (40MPa:80 perc) kezeléssel további javító hatás érhető el.

Az in vivo kísérletünk során a stresszkezelt (HP-FT, HP3, 40MPa:80 perc) és kontroll (C-FT) mélyfagyasztott ondóval mesterséges termékenyítéseket (AI) végeztünk. A HP-FT csoportban a vissza nem ivarzó aránya (86,2% vs. 64,7%), a vemhesülési arány (82,3% vs. 60,8%) az összes malac/alom (10,8±4,5 vs. 8,0±3,8) és az élő malac/alom (9,4±4,2 vs. 7,3 ±3,6) szignifikánsan nagyobb ($P < 0,05$) volt, mint a C-FT csoportban. A fialási arányban a kísérleti csoportok között nem szignifikáns ($P > 0,05$), de számbeni növekedés (78,4% vs. 58,8) volt megfigyelhető. A HP-FT kocacsoporthoz a vissza nem ivarzás közel három és félszer (Fisher teszt, $OR=3,3$), a vemhesülés háromszor (Fisher teszt, $OR=2,9$) és a fialás esélye két és félszer (Fisher teszt, $OR=2,5$) nagyobb volt, mint a C-FT kocacsoporthoz. További nem szignifikáns különbség ($P > 0,05$) volt mind a két kísérleti csoportban a vemhesült és a nem vemhesült kocák termékenyítésére felhasznált adagok TM%-a és PM%-a között, valamint a TM%, a PM% értékei és az összes malac/alom között is (Pearson féle korrelációs együttható, $r=0.11-0.20$). Habár a HP kezelés növelte a mozgást és javította a szaporodásbiológiai mutatókat, de e két javított érték között nem lehetett közvetlen kapcsolatot találni. Az in vitro és in vivo kísérleteink során kapott eredmények arra engednek következtetni, hogy a HP kezelés – a mozgásra kifejtett javító hatásán túl – hatással lehet a spermiumok más életfunkcióira is, ami a javuló szaporodásbiológiai teljesítményt eredményezi. Az egyes vizsgálati időpontokban (fialáskor, választáskor és a választást követő két hét múlva) a testtömegben és a malacok számában mért szignifikánsnak nem ($P > 0,05$) tekinthető különbség azt mutatja, hogy a HP kezelésnek nem volt negatív hatása sem a malacok túlélésére, sem a testtömeg gyarapodásra. Az FT ondó gyakorlati felhasználásával kapcsolatos ismereteket az innovációkkal szerzett tapasztalatainkkal tovább bővítettük, amikor a mélyfagyasztást megelőző HP-val javított szaporodásbiológiai eredményeket értünk el. Továbbá bizonyítottuk, hogy az RT-n végzett HP kezeléssel az ondókezelés teljes folyamatát – beleértve a krioprotektánsokat tartalmazó higitókat is – RT-re lehet optimalizálni. Az így mélyfagyasztott ondóval ovuláció indukció nélküli cervikális termékenyítéssel – ellentétben a standard mélyfagyasztási (higitások hőmérséklete 15-17°C és 5°C; programozható mélyfagyasztás) és AI protokollokkal (intrauterin, mély intrauterin és/vagy hormonális kezelések) – a korábbi tanulmányokhoz hasonló és tenyésztési

szempontból is elfogadható eredményeket lehet elérni (fialási arány: 51-78% vs. 78,4%; összes malac/alom: 8,0-12,5 vs. 10,8).

További in vitro vizsgálatok szükségesek ahhoz, hogy jobban megértsük a HP kezelésnek a spermiumokra kifejtett hatását, amely új lehetőségeket nyithat az eredményesebb, gazdaságosabb felhasználáshoz és a HP technológia fejlesztéséhez.

2. Bevezetés

A világ lakosságának a száma 2010-ben 6,9 milliárdra volt tehető, amely 2050-re – a növekedési arány csökkenésének az ellenére (1963-ban 2,2%, 2011-ben 1,1%) – 7,5-10,5 milliárdot is elérheti (http://en.wikipedia.org/wiki/World_population). A növekvő népességgel folyamatosan nő a húsfogyasztás mértéke. A megnövekedett igény kielégítése jelentős mértékben függ a sertéshús előállításától, mivel az évenként elfogyasztott vöröshús mennyiségének kb. 40%-át a sertéshús teszi ki. A 98,9 millió tonnáról (2006) előzetes becslések alapján 2020-ra 125 millió tonnára fog emelkedni a sertéshús előállítása, amelyben a fejlődő országok sertéstenyésztése vezető szerepet fog játszani (Gerrits et al., 2005). A világ sertésállományának legnagyobb része Kínában található (47%, 400.7 millió sertés), ahol 2006-ban 20%-kal nőtt a sertéshús fogyasztása és a következő években további növekedés várható (<http://en.wikipedia.org/wiki/Pork>).

Az új fajtáknak, a tartási és takarmányozási technológiáknak köszönhetően nagyobb lett az állatok takarmányértékesítő képessége, növekedési erélye és nőtt az egy koca után előállított éves színhús mennyisége (Gerrits et al., 2005). Ehhez a folyamathoz lendületet adtak azok a szaporodásbiológiai kutatások, amelyeket napjainkban mesterséges termékenyítési (AI) technológiaként alkalmaznak. Az AI igazi térhódítása azokkal a javított összetételű spermahígítókkal kezdődött, amelyekkel az ondót közel szobahőmérsékleten és hosszú távon (5–7 nap) lehetett tárolni. Ha a spermiumokat ennél is hosszabb ideig kell tárolni, akkor a mélyfagyasztás alkalmazása elkerülhetetlen (Johnson et al., 2000). A glicerinnel a mélyfagyasztás során a bikaspermiumokra kifejtett védő hatása hasonló eredménnyel kecsegtetett a kanondó esetében is, azonban az korán kiderült, hogy ennél ez nehezebb feladat (Polge et al., 1949). A következő sikerek mintegy két évtizedet vártak magukra, amikor először számoltak be a mélyfagyasztott (FT) sertésondóval – még „véres módszerrel” (sebészi úton a petevezetőbe) – elért első vemhességről (Polge et al., 1970). Ezt követték a sertés FT ondót cervikálisan alkalmazó első sikeres termékenyítések (Pursel et al., 1971).

1975-ben dolgozták ki azt a mélyfagyasztási módszert, ami a kanondósejtek figyelemreméltó túléléséhez vezetett és lehetőséget adott az FT ondó kereskedelmi célú felhasználására (Pursel & Johnson, 1975; Westendorf et al., 1975). Ez a módszer az alapja – kisebb-nagyobb módosításokkal – valamennyi, napjainkban alkalmazott mélyfagyasztási módszernek is (Woelders, 1997; Großfeld et al., 2008). Mindezek ellenére – pl. a szarvasmarhával ellentétben – az AI-k mindössze kb. 1%-a történik FT spermával, mert gazdaságossága elmarad a friss spermától (FS) (Roca et al., 2006a, Knox, 2011). A vemhesülési és a fialási arány 20–30%-kal,

a megszületett malacsám almonként 2–3 malaccal kevesebb, mint az FS-t alkalmazó AI-ké (Johnson et al., 1981; Johnson, 1985; Johnson et al., 2000; Roca et al., 2006b). Az ok a mélyfagyasztás és felolvasztás során a spermiumok szerkezeti és funkcionális károsodása, ami csökkent élet- és termékenyítőképességhez vezet in vitro körülmények között és a női nemi utakban is (Waberski et al., 1994; Watson, 2000).

Az elmúlt évtizedekben mélyfagyasztás károsító hatásainak elkerülésére, csökkentésére és a telepi felhasználás gazdaságosságának a növelésére számos mélyfagyasztási és AI technológiai módosítás vagy ezek együttes alkalmazása látott napvilágot. Ezek között találjuk a programozott mélyfagyasztó alkalmazását (Roca et al., 2003; Bolarin et al., 2006; Wongtawan et al., 2006; Bathgate et al., 2008; Didion et al., 2013); az új csomagolásokat a FlatPack (Eriksson et al., 2002) és a MiniFlatPack (Wongtawan et al., 2006) formájában, amelyekben az előnyösebb térfogat és felület aránnyal már egy termékenyítő adagot lehet mélyfagyasztani; az egy termékenyítő adagban felhasznált spermiumok számának a csökkentését (Roca et al., 2003; Bolarin et al., 2006; Bathgate et al., 2008); az ovuláció idejéhez igazított AI-k számát (Bolarin et al., 2006; Wongtawan et al., 2006; Bathgate et al., 2008; Buranaamnuay et al., 2010); az AI-k és a megtermékenyítés helyszíne közötti távolság csökkentését különböző termékenyítő katéter típusokkal a méhtestbe (UI) (Casas et al., 2010) vagy mélyen a méhszarvakba (DUI) (Roca et al., 2003; Bolarin et al., 2006; Bathgate et al., 2008; Buranaamnuay et al., 2010) és az AI-k és az ovulációk közötti időtartam csökkentését hormonális ovuláció indukcióval (Roca et al., 2003; Bolarin et al., 2006; Wongtawan et al., 2006; Bathgate et al., 2008; Buranaamnuay et al., 2010).

Napjaink újabb kutatási irányvonala azokra a korábbi megfigyelésekre vezethetők vissza, amelyek szerint a sertés spermiumok ellenállóképessége – az inkubáció során a hideggel, a hígítással, a hűtéssel, a tárolással és/vagy a mélyfagyasztással szemben – lényeges, szerzett és megváltoztatható tulajdonság (Pursel et al., 1973). Ezek a tapasztalatok az alapjai azoknak az innovációknak, amelyekben a szubletális stresszt, mint ellenálló képességet fokozó hatást, sikeresen alkalmazták egér blasztociszták (Pribenszky et al., 2004; Pribenszky et al., 2005a), szarvasmarha embriók (Pribenszky et al., 2005b), bika spermiumok (Pribenszky et al., 2007) és sertés petesejtek (Du et al., 2008; Pribenszky et al., 2008) mélyfagyasztásában.

Kísérleteink célja volt, hogy vizsgáljuk a hidrosztatikai nyomással kiváltott stresszkezelésnek (HP) az FT sertés spermiumok in vitro paramétereire és telepi körülmények között (cervikális termékenyítéssel hormonális szinkronizáció nélkül) a szaporodásbiológiai eredményekre kifejtett hatását.

3. Irodalmi áttekintés

3.1. A mélyfagyasztás hatása a sertés hímivarsejtjeire

3.1.1. Fizikai és kémiai változások

A hímivarsejtek hosszú távú eltarthatóságának az alapja az anyagcserefolyamataik csökkentése vagy reverzibilis gátlása. Ennek a legszélesebb körben alkalmazott formája a hűtés és a mélyfagyasztás. Az alacsony hőmérséklet, a hőmérsékletváltozás, a spermiumok és környezetük között lejátszódó fizikai és kémiai változások káros hatásúak az emlősök hímivarsejtjeire. A sertés hímivarsejtek – ellentétben más gazdasági haszonállat fajokkal (pl. bika) – az egyik legérzékenyebb biológiai rendszerként ismertek (Woelders et al., 2005). Ha a hőmérséklet 0°C alá csökken, akkor a hímivarsejt és környezete továbbra is folyékony halmazállapotú marad, mert a fagyáspontjuk ennél alacsonyabb. Az egész rendszer ún. túlhűtött („supercooling”) állapotba kerül. A hőmérséklet további csökkentésével, a fagyasztás sebességétől és a hígító összetételétől függően – kb. -5°C és -15°C közötti tartományban – elsőként a hígító kezd megfagyni, ami a sejten kívüli térben jégkristályok képződésével jár, miközben az intracelluláris tér még mindig folyékony túlhűtött állapotban van. Ennek az oka feltehetően a sejtmembrán, ami egy természetes gátat képez, kezdetben megakadályozza a jégkristályoknak a sejten belüli térben való kialakulását. A sejten kívül megfagyott vízből az oldott sók kiszorulnak és a meg nem fagyott részben koncentrálnak. Ez egyre nagyobb ozmotikus nyomáskülönbséget alakít ki a sejten belüli térrel, aminek a hatására a sejten belüli víz kifelé áramlik és megfagy. Ezzel kezdetét veszi a sejt dehidrációja (Mazur et al., 1972; Mazur, 1977; Muldrew & McGann, 1990). Túlságosan lassú hűtési sebességnél az intracelluláris víznek kellő ideje van, hogy megvédje a sejtet az intracelluláris kristályképződéstől, azonban a különböző oldott sók a sejten belül maradnak és koncentrálnak. A sejten belül megváltozott pH és a megemelkedett iontartalom károsodást eredményezhet. Ha a hűtés sebessége túlságosan gyors, akkor a víz kiáramlásának sebessége nem képes lépést tartani a hűtés sebességével, a sejt fokozatosan túlhűtött állapotba kerül. Az extra- és az intracelluláris tér közötti egyensúlyi állapot (equilibrium) hiányában az extracelluláris térben elinduló jégkristályképződés időpontjában nagyobb lesz a sejten belüli közeg folyékony tartalma, ami elérve a fagyáspontját, megfagy. A sejten belül így nagyméretű kristályok képződnek, amelyek roncsoló hatásúak (Mazur, 1963; Mazur, 1977; Muldrew and McGann, 1990; Woelders et al., 2005). A mélyfagyasztás során alkalmazott fagyasztási sebességnek lassúnak kell lennie ahhoz, hogy a fokozatos dehidrációval megelőzze a sejten belüli jégkristályképződést, de mégis gyorsnak, hogy ne alakulhasson ki a nagy intracelluláris ionkoncentráció az ún. „solution effect”

károsító hatása (Daw et al., 1973; Griffiths et al., 1979). A cél, a sejt és környezete közötti egyensúlyi állapot elérése, ahol a sejt fokozatosan dehidrálttá válik, miközben megakadályozza a sejten belüli jégkristályok képződését.

3.1.2. Szabad gyökök és a redox rendszerek

A szabad gyökök egy vagy több páratlan vegyértékű elektronnal, vagy nyitott elektronhéjjal rendelkező olyan atomok vagy molekulák, amelyek számos anyaggal képesek reakcióba lépni. Valamennyi élő sejt aerob és részben anaerob körülmények között termel szabad gyököket, ami a normális sejt működés következménye. Ez alól az emlős sejtek sem kivételek. A szabad gyökök között találjuk a szuperoxid aniont (O_2^-), a hidrogen-peroxidot (H_2O_2), a hidroxilgyököt (OH^\cdot). A szabad gyökök eltávolítására az ondó komplex redoxrendszerrel rendelkezik. A spermiumokat védő antioxidáns rendszerek elsősorban citoplazma eredetűek. Ezek között találjuk az enzimeként működő glutation-peroxidázt, a katalázt és a szuperoxid-dizmutázt (Bilodeau et al., 2001; Aitken & Baker, 2004), de tartalmazznak nem enzimikus képességű antioxidáns molekulákat is, ilyenek az albumin, az alfa-tokoferol, a glutation, a C-vitamin, a taurin vagy a hipotaurin (Brzezinska-Slebodzinska et al., 1995). Az ondó in vitro kezelése a redox rendszer egyensúlyi állapotának a felbomlásához vezet. A spermiumok már a mellékherében történő érésük során elveszítik a citoplazma eredetű antioxidáns rendszerük jelentős részét, majd az ejakulációval egy még kisebb antioxidáns képességgel rendelkező ondóplazmába kerülnek (Brouwers et al., 2005). Az ondó kezelése (hígítások és a centrifugálás) az ondóplazma részleges vagy teljes eltávolítását jelenti a benne lévő maradék antioxidánsokkal együtt. Az ondó további tárolása is aerob körülmények között történik – érintkezik levegővel és fénnel –, amely tovább fokozza a szabad gyökök termelését (Gaczarzewicz et al., 2003). Közvetlen és közvetett megfigyelések bizonyítják, hogy a mélyfagyasztás számos lépése a szabad gyökök keletkezésével és az antioxidánsok csökkenésével járhat (Bilodeau et al., 2000). A redoxrendszerek egyensúlyának felbomlása hatással van a hímivarsejtek életműködésére, mivel a peroxidok gyors és visszafordíthatatlan szerkezeti változást idéznek elő. Ez fokozottan nagy veszélyt jelent a kan hímivarsejtjeire, mivel nagyon nagy a sejtmembránok foszfolipidjeiben a telítetlen zsírsavak aránya (Cerolini et al., 2000). A lipidperoxidáció irreverzibilis motilitáscsökkenéshez, a sejtlegzés gátlásához, az intracelluláris enzimek eltűnéséhez és a dezoxiribonukleinsav (DNS) károsodásához vezet (Baumber et al., 2003). Mivel a mozgáshoz szükséges energiát a mitokondriumok biztosítják, ezért a mitokondriális DNS és a mitokondriumok szerkezetének oxidatív károsodása lehet az egyik magyarázat a

mélyfagyasztott spermiumok csökkent mozgására és termékenyítő képességére vonatkozóan (Cummins et al., 1994).

3.1.3. Sejtmembrán

A hímivarsejtek kettős foszfolipid sejtmembránja nem csak a megtermékenyítés folyamatában, hanem a mélyfagyasztás hatásainak a befolyásolásában is fontos szerepet játszik. A sejtmembrán lipidkomponensei között a különböző lánchosszúságú telített és telítetlen zsírsavak és a koleszterin is szerepel. A lipidek körülbelül 60%-a a többszörösen telítetlen zsírsavakból származik, amelyek a számtalan kettős kötés miatt a koleszterinnel együtt a sejtmembránnak megfelelő féligáteresztő képességet és kellő folyékonyt kölcsonöz. A sertésspermiumok sejtmembránjainak telítetlen zsírsav tartalma 25% dokozapentaénsavból (C22:5 n-6) és 30% dokozahexaénsavból (C22:6 n-3) áll (Parks & Lynch 1992; Penny et al., 2000). A telítetlen zsírsavak nagy aránya miatt a sertésspermiumok a szabad gyökökkel szemben különösen érzékenyek (Parks & Graham 1992; Maldjiana et al., 2005). A sejtmembránok koleszterintartalma kisebb sertésben és kiskérődzőkben jobb eredménnyel mélyfagyasztható a humán-, a húsevő- és a szarvasmarha-spermiumokkal szemben. A koleszterin a mélyfagyasztás során képes meggátolni a foszfolipidek túlzott mértékű elmozdulását és átrendeződését (Brouwers et al., 2005), azonban az alacsonyabb koleszterin/foszfolipid arány miatt a membránoknak a „folyékony” állapotból a „gél” állapotba való átmenete a hűtés során már hamar végbemegy. Ez a sertés hímivarsejtek foszfolipidjeiben vissza nem fordítható átrendeződést eredményez, ami a sejtmembrán féligáteresztő képességének elvesztéséhez és végül szakadásához vezet (Maldjiana et al., 2005). A sejtmembránok eltérő összetétele is magyarázatot adhat a mélyfagyaszthatóságban rejlő különbségekre, valamint a szerkezeti összetétel megváltoztatása okozhatja a mélyfagyasztás kudarcát (Parks & Graham 1992).

3.1.4. Kriokapacitáció

A kapacitáció az emlős spermiumoknak a női nemi utakban lejátszódó érési folyamatának utolsó előtti lépése, amelyet az akroszóma reakció követ. Ez a két, megfelelő időben és helyen végbemenő folyamat elkerülhetetlenül szükséges ahhoz, hogy a hímivarsejt a petesejtet megtermékenyítse. Kocában a kapacitáció előtti állapotban lévő spermiumok a petevezető szűk szakaszának (isztmusz) caudalis részében, a nyálkahártya hámsejtjeihez kapcsolódva, spermarezervoárt hoznak létre. A kapcsolódás a kapacitáció folyamatát gátolja, azonban ennek megszűntével a kapacitáció elindul (Petrunkina et al., 2005). A kapacitáció számos egymásra

épülő biokémiai lépések sorozata, amely számos pozitív, destabilizációs folyamatot foglal magába, ami a sejtmembrán szerkezeti átalakulásához vezet (Vadnais et al., 2005a). Elsőként a koleszterin és a mellékherében vagy a járulékos nemi mellékmirigyek váladékából nyert ún. dekapacitációs fehérjék – kanokban az anti-agglutinin – oldódnak ki a sejtmembránból (Vadnais et al., 2005b). A koleszterin eltávolítása elősegíti bizonyos membránfehérjékben a tirozin foszforilációját, amelyet további albuminszerű fehérjék, a hidrogénkarbonát- (HCO_3^-) és a kalcium ion (Ca^{2+}), mint kapacitációs faktorok támogatnak. E változások hatására megnő a sejtmembrán ioncsatornáinak átteresztőképessége, amely további Ca^{2+} és HCO_3^- beáramlást eredményez. Ezek közvetlenül katalizálják a cAMP termelődését, ami a spermiumoknak hiperaktív mozgást kölcsönöz. A sertésspermiumok mélyfagyasztása során a kapacitáció folyamatához részben hasonló, ún. kriokapacitációs változásokat lehet megfigyelni, de a tirozin foszforilációja és a HCO_3^- beáramlása különböző mennyiségben és formában jelentkezik (Kaneto et al., 2002, Leahy & Gadella, 2011). Az idő előtti kriokapacitáció miatt a spermiumok nem, vagy csak csökkent mértékben képesek a petevezető nyálkahártyájához kapcsolódni és spermaraktárt kialakítani. Habár az így kapacitálódott spermiumok is képesek lennének a petesejtek megtermékenyítésre, azonban az akroszómareakció gyors beindulásával elpusztulnak még mielőtt a petevezetőbe érnének. Valószínű ennek is szerepe van abban, hogy az FT spermiumoknak jelentősen rövidebb az életképessége az FS ondóban lévő hímivarsejtekhez képest (Holt & Medrano, 1997; Fazeli et al., 1999).

3.1.5. DNS

A fagyasztás és felolvasztás folyamata nem csak a mozgásra és a membránokra van hatással, hanem az örökítő anyag tömörítettségére és stabilitására is (Cordova et al., 2002). Azon túl, hogy az emlősspermiumok haploidok, egyben sajátos nukleoprotein szerkezettel is rendelkeznek. A sejtmag fehérjék legnagyobb csoportját a protaminok családjába tartozó fehérjék alkotják, amelyek a spermatogenezis során az eltávozó hisztonok helyét elfoglalva diszulfid hidakkal inter- és intramolekulárisan kapcsolódnak a DNS-hez (Jiang et al., 2007). A protaminok kisméretű, savi természetű fehérjék, amelyek a DNS-sel egy komplex szerkezetet alkotva az örökítő anyagnak megfelelő tömörítettséget és stabilitást biztosítanak. Ez a tömörített szerkezet szükséges a DNS átmeneti inaktiválásához, védelméhez és a termékenyítő képesség megőrzéséhez. A protaminok két formája közül a protamin-1 valamennyi állatfajban így a sertés ondósejtekben is előfordul (Flores et al., 2008). Humán és sertésekkel végzett kísérletekben igazolták, hogy a spermium kromatin állománya jelentősen megváltozik a fagyasztás és a

felolvasztás során, ami nagyobb mértékű tömörítettséget eredményezhet. Ez a túlságosan stabil kromatin késlelteti az apai örökítő anyag formálódását a megtermékenyítés során, ami csekélyebb mértékű embrionális fejlődést és nagyobb arányú korai embrióvesztést okoz (Hamamah et al., 1990). A DNS töredezettsége és az egyes állatfajok hímivarsejtjeinek termékenyítő képessége között szoros kapcsolat van. A mélyfagyasztás a DNS fragmentálódását is előidézheti (Fraser & Strzezek, 2005), mindazok ellenére, hogy a spermiumok egyéb tulajdonságaiban (mozgás, életképesség) nem volt megfigyelhető változás. A töredezett DNS-sel rendelkező spermium is képes mozogni és a petesejtbe hatolni, azonban az ebből származó embriók az osztódás 4–8 sejtjes állapotában elpusztulnak (Silva and Gadella 2006). Hasonló eredményre jutottak más szerzők is, de a fagyasztás és a felolvasztás kromatinra kifejtett negatív hatását nem az örökítő anyag töredezettségében, hanem a protamin-DNS kapcsolat gyengülésében látják. Ezek a változások már a mélyfagyasztás kezdeti folyamatában megjelennek, kiterjednek a teljes örökítő anyag egészére, és a termékenyítést követő osztódási folyamatok zavarát okozzák (Flores et al., 2008). Mások által ezek az elváltozások nem voltak igazolhatóak (Hernandez & Roca, 2006). A különböző megfigyelések ellenére mégis megállapítható, hogy az örökítő anyag megfelelő minősége és állandósága befolyásolja a mélyfagyasztott sperma felhasználhatóságát.

3.1.6. Sokkfehérjék

A sokkfehérjék (HSP60, HSP70, HSP90) a kapron fehérjecsaládhoz tartozó molekulák. A HSP90 számos emlősfajban a szöveti fehérjetartalomnak kb. 1–3%-át alkotja. A szerepük az élettani folyamatokban még nem ismert, de fontos szerepet játszanak a stresszel szembeni ellenálló képesség kialakításában és a fehérjék védelmében (Huang et al., 1999). A hőmérsékletemelkedéssel járó stressz hatására termelődő HSP70 a fehérjeszintézis egyensúlyára kifejtett hatással képes a sejtek számára védelmet biztosítani. A kapron fehérjék segítik a citoplazmában, a mitokondriumokban és az endoplazmatikus retikulumban lévő egyéb proteinek működését (Santoro, 2000). A HSP90 aktiválni képes a nitrogén-oxid-szintáz működését (Lewis et al., 1996), ami további védő szerepet jelent a károsító oxidatív stresszel szemben (Conconi et al., 1996) és az adenzin-trifoszfát (ATP) anyagcseréjében (Prodromou et al., 1997). A mélyfagyasztásnak a HSP90-re kifejtett kedvezőtlen hatása a HSP90 mennyiségének a csökkenéséből vagy a sérült sejtmembránon keresztüli fokozott „szivárgás”-ból ered. A legnagyobb csökkenést az 5 °C-ra való hűtés során lehetett megfigyelni (a kezdeti mennyiség mindössze 64%-a volt kimutatható), miközben a spermiumok mozgásában még nem

volt változás. További -100 °C-ra való hűtés alkalmával már mindkét értékben csökkenés mutatkozott. Ez azt jelzi, hogy a HSP90 csökkenése megelőzi a spermiumok mozgásában bekövetkező változást, ami az ATP–raktárak kimerülését és végül a spermiumok csökkent mozgását okozza (Huang et al., 1999). A HSP-nek a szaporodásbiológiai folyamatokban betöltött szerepe nagyon sokrétű, azonban további vizsgálatok szükségesek az egyes folyamatokban betöltött szerepe tisztázásához.

3.1.7. Ondóplazma

Az ondóplazma legnagyobb része a járulékos nemi mirigyek, kisebb része az ondóvezető és mellékhere váladékából áll. Kanokban a különösen hosszan tartó ejakuláció során távozó ondót a spermiumok koncentrációja, a különböző elektrolitok és fehérjék koncentrációja alapján három frakcióra lehet felosztani. Az első frakció (5–20%) a húgycső falában levő mirigyek, a bulbourethralis mirigy (Cowper–mirigy) és a prosztatata váladékából áll. Kisebb számban tartalmaz hímivarsejteket és nagy a nátrium- (Na^+) és klorid-ion (Cl^-) tartalma. A második, az ún. „sperma gazdag” frakció (kb. 60–80 ml) a mellékhere, az ondóhólyag és a prosztatata váladékában az ondósejtek 80–90%-át tartalmazza. A spermagazdag frakció első 10–15 ml-rében (P1) ürül a spermiumok legnagyobb része, majd a frakció további részében (P2) jelentősen csökken a mennyiségük. A harmadik frakció (40–60%) – egyre kevesebb hímivarsejt tartalommal – elsősorban az ondóhólyag, kisebbik részben a prosztatata és a bulbo-urethralis mirigy váladékából áll, szintén magas Na^+ -, Cl^- -ion- és szialinsavtartalommal. A spermiumok folyamatosan változó összetételű ondóplazmába kerülnek attól függően, hogy az egyes járulékos nemi mirigyek váladéka az adott pillanatban milyen arányú az ondóplazmában: a mellékhere hypotaurint, karnitint, egyéb aminosavakat; az ondóhólyag fruktózt, citromsavat, cinket; a bulbo-urethralis mirigy szialinsavat, a prosztatata citrátot, cinket termel (Mann & Lutwak-Mann, 1981). Az ondóplazma a spermiumokra kifejtett hatása nagyon sokrétű, ami jelentősen függ az egyes frakciók összetételétől: növeli a sejtek mozgását (Rodríguez-Martínez, 1991), a membránok stabilitását (Maxwell & Johnson, 1999) a hideg sokkal (Pursel et al., 1973) és az oxidatív stresszel szembeni ellenálló képességet (Roca et al., 2004), mérsékeli a mélyfagyasztásnak a DNS-re kifejtett károsító hatását (Fraser & Strzezek, 2005).

Az ejakuláció alatt a különböző váladékokkal a fehérjék is folyamatosan, de változó mértékben ürülnek. A spermagazdag frakció végén jelentősen több a fehérjék mennyisége, mint az elején. A fehérje tartalom szinte kizárólag spermadhezin (12-16 kDa), amely a spermiumok felületéhez hozzákapcsolódva fontos szerepet játszik a megtermékenyítésben (Pena et al., 2006). Léteznek

az ún. nem heparinhoz kötődő spermadhezinek is, amelyek a frissen hígított és a mélyfagyasztott ondóban is a spermiumok mozgását, életképességét és a mitokondriális aktivitást védik (Caballero et al., 2004). Ezzel szemben vannak olyan fehérjefrakciók is, amelyek kedvezőtlen hatásúak a spermiumok életfunkcióira. A heparinhoz kötődő spermadhezinek hátrányosan befolyásolják a sertésspermiumok mozgását (Centurion et al., 2003). A sertésondóban kis molekulatömegű (5.7 kDa) antibakteriális hatással rendelkező gátló fehérjéket is kimutattak (Strzezek et al., 1992).

A HCO_3^- -nak is fontos szerepe van a spermagazdag frakcióban ürülő spermiumok mozgásának aktiválásában. A mozgást a HCO_3^- függő enzim, az adenil-cikláz aktiválja, amely a folyamat közvetlen, specifikus és pH-független irányítója. A mellékhere savas közegű, ahol a HCO_3^- tartalom az 1/10-re csökken ($32,2 \pm 3,81$ vs. $3,16 \pm 0,23$ mmol/l), ami az ejakuláció során az ondóhólyag tartalmának a hozzákeveredésével ismételt többszörösére emelkedik ($23,9 \pm 0,95$ mmol/l) (Rodríguez-Martínez, 1991). Ez a magyarázata annak, hogy a sperma gazdag frakció első részének a HCO_3^- koncentrációja a legalacsonyabb (Rodríguez-Martínez et al., 2005). A női nemi utak alacsony HCO_3^- koncentrációja is segít kezdetben megőrizni a P1 során ürülő spermiumok termékenyítő képességét, szemben a már kezdettől fogva magasabb HCO_3^- tartalommal rendelkező P2 eredetű spermiumokkal (Rodríguez-Martínez 2007). A P1 spermiumok kisebb mértékben érzékenyek a mélyfagyasztás során a hidegsokkal szemben, mint a teljes ejakulátumból vagy a P2-ből származó spermiumok és ezek alkotják a női nemi utakban a spermarezervoár legnagyobb részét (Rath and Niemann, 1997). A főleg mellékhere eredetű, javító hatású fehérjéket tartalmazó P1, a gátló hatású nagy spermadhezint tartalmazó P2 és a különböző HCO_3^- koncentrációk adhatnak magyarázatot az egyes ondóplazma frakcióknak a mélyfagyasztás során a spermiumok védelmében betöltött szerepére és a P1 eredetű hímivarsejtek eredményesebb fagyaszthatóságára (Saravia et al. 2007).

Az ondóplazma méhbe kerülése előnyös hatású az ovulációra, a megtermékenyülésre rágcsálókban és sertésben, elősegíti a méh összehúzódását és serkenti a gyulladásszerű folyamattal szembeni válaszkészséget, valamint az implantációt. Valószínűleg a kellő mennyiségű ondóplazma hiányának is tulajdonítható a nagyon kis térfogatú, szexált spermával elért nagyon alacsony vemhesülési arány. Az ondóplazma mennyisége túlságosan kevés ahhoz, hogy kiváltsa a gyulladásszerű folyamatok előfutáraként ismert citokinek termelődését és serkentsen a megtermékenyítést és az implantációt megelőző tisztító szerepet ellátó polimorfonukleáris sejtek méhbe való áramlását (Kirkwood et al., 2008).

Az ondóplazmában való tárolási időtartamnak is szerepe van a spermiumok későbbi hígedsokktűrésében. A szobahőmérsékleten a saját, FS ondóplazmában való rövid (kb. 60 perc) idejű inkubáció kedvező, de a hosszabb idejű inkubáció (20 óra) kifejezett károsító hatással volt a mélyfagyaszthatóságára (Tamuli and Watson, 1994). A kriokapacitáción átesett spermiumok nem alkalmasak a petevezetőben megfelelő spermarezervoár kialakítására, azonban az ondóplazma képes a FS és a FT spermiumokat in vitro körülmények között megvédeni a kriokapacitációtól és képes a kriokapacitációt visszafordítani (Vadnais et al., 2005a). Ez alapján feltételezhetnénk, hogy az ondóplazma–kiegészítés javítja az FT ondóval történő termékenyítés eredményeit. Ezzel szemben a 10% ondóplazma–kiegészítés sem a hímivarsejtek spermarezervoár képzésére, sem a fialási arányra nem volt hatással, mindannak ellenére, hogy a termékenyítések az ovuláció előtti 2 órán belül történtek (Kirkwood et al., 2008). Feltételezhetően az ondóplazma minimális mennyisége (kb. 30%) szükséges ahhoz, hogy az in vitro eredményekben megfigyelt védőhatások in vivo körülmények között is érvényesüljenek.

Az ondóplazma eltérő hatását vélték felfedezni az ún. „jól” és „rosszul” fagyasztható ondójú kanok esetén. A „jól” mélyfagyasztható ondók esetén az ondóplazma eltávolítása nem volt hatással, de a „rosszul” mélyfagyasztható sertésondó esetében szignifikáns csökkenés volt megfigyelhető a FT utáni mozgásban. Az ondóplazma hiánya mindkét csoportban – függetlenül attól, hogy „jól” vagy „rosszul” fagyasztható sertésondókról volt-e szó – megnövekedett kriokapacitáció és akroszóma károsodás jelentkezett. Ezek méretéke jelentősen csökkenthető volt, ha a kiolvasztást követően a hígítóhoz 10% ondóplazmát adtak (Okazaki et al., 2009).

Az FT sertésondó szaporodásbiológiai eredményességének a javításához a fentiekben összefoglalt sertés hímivarsejteket érő káros hatások megszüntetésére, de legalább is csökkentésére vagy a sejtkárosodások különböző formájú kompenzálására van szükség. Ez jelentheti az ondókezelés és a mélyfagyasztás egyes lépéseinek megváltoztatását –, ami érintheti a spermiumokat vagy az őket körülvevő környezeti hatásokat (hígítók, centrifugálás, mélyfagyasztás stb.) –, de lehetőség van az AI technológia módosítására vagy ezek együttes alkalmazására is.

3.2. A sertésondó mélyfagyasztásának eredményességét javító hatások

Az FS és az FT spermiumok in vitro értékeit javító anyagok közül az egyik legszélesebb körben tanulmányozott az antioxidánsok szerepe. Großfeld et al. (2008) és Rodriguez-Martinez & Wallgren (2010) által készített összefoglaló tanulmányok részletes áttekintést adnak a különböző antioxidánsoknak (butil-hidroxi-toluol, kataláz, glutation, szuperoxid-dizmutáz, E-

vitamin, Trolox) a sejtmembránokra (fej, akroszóma), a mélyfagyasztás utáni összes és progresszív mozgásra, a lipidek peroxidációjára, a morfológiára, az élő/holt arányra, a DNS állapotára, a mitokondriális aktivitásra kifejtett hatásáról. Beszámolnak a hűtési, fagyasztási és kiolvasztási sebességeknek – a különböző krioprotektáns (glicerin, trehalóz) koncentrációkkal – a spermiumok túlélésére kifejtett hatásáról is.

Nem csak az antioxidánsokkal lehet stabilizálni a membránokat és biztosítani a DNS védelmét, hanem a hasonló hatás érhető el a koleszterin, a különböző lipidek és a ondóplazmában lévő bizonyos fehérje frakciók felhasználásával is (Leahy & Gadella, 2011). A számos in vitro kísérletben elért javító hatás ellenére jelentősen alacsonyabb azoknak a telepi kísérleteknek a száma, amelyek a javított in vitro paramétereknek a szaporodásbiológiai értékekre kifejtett hatását telepi körülmények között is vizsgálja. Ezeknek az in vivo kísérleteknek a kisebb száma a mélyfagyasztási technológia, a nagyobb száma az AI technológia módosításával növelte a felhasználás eredményességét.

A sertésondó mélyfagyasztása során többféle csomagolást lehet használni. Ezek közül a legszélesebb körben alkalmazott a Maxi (5 ml) és az ún. „feles” (0,5 ml) szalma, de a legjobb felolvasztás utáni in vitro eredményt az ún. „negyedés” (0,25 ml) szalmával érték el (Bwanga et al., 1990). Ennek az oka: a szalma nagy felületéhez képest kis térfogat, ami a mélyfagyasztás és a felolvasztás során a legkedvezőbb és legegységesebb hőáramlási feltételeket képes biztosítani. Eriksson et al. (2002) egy új csomagolási formát az ún. FlatPack-et fejlesztették ki. A FlatPack a nagy térfogatával (5 ml) és felületével a 0,25 ml-es szalmákra jellemző termodinamikai előnyeket kapcsolta össze. A FlatPack-ben FT ondóval végzett AI-vel a természetes fedeztetéshez és a FS-t alkalmazó AI-hez hasonló eredményeket (fialási arány, összes malac/alom, élő malac/alom szignifikánsan nem különbözött) érték el. Az ígéretes új csomagolási forma ellenére a további telepi kísérletek visszatértek a hagyományosnak mondható 0,5 ml-es szalmához és az AI technológia módosítását helyezték előtérbe.

Roca et al. (2003) hormonális ovuláció indukciót alkalmazva (eCG/hCG) kocákat termékenyítettek egy alkalommal FT-t (1×10^9 sp./term. adag) és FS-t (150×10^6 sp./term. adag) alkalmazó DUI-val, valamint FT-vel (6×10^9 sp./term. adag) hagyományos cervikális úton. A fialási arányban, az összes malac/alom számban sem volt szignifikáns különbség a kísérleti csoportok között. A további telepi kísérleteikben hasonló termékenyítési adagokat alkalmaztak DUI-val (FT: 1×10^9 sp./term. adag, FS: 150×10^6 sp./term. adag) ovuláció indukció nélkül kétszeri AI-vel (ivarzás kezdetét követő 30. és 42. óra). Csak a fialási arányban volt szignifikáns különbség az FS-t alkalmazó termékenyítések javára, az összes malac/alom számban nem. Bathgate et al. (2008) is a kétszeri (ivarzás kezdetét követő 24 és 36 óra) DUI-val (1×10^9 sp./term. adag) a

cervikálisan FS-t alkalmazó AI-hez hasonló eredményeket kaptak. A DUI-t alkalmazó telepi kísérletekkel igazolták, hogy a DUI-t alkalmazó kisebb sejtszámú FT termékenyítő adagokkal az FS termékenyítéshez hasonló eredményeket lehet elérni.

Bolarin et al. (2006) hormonális kezelés nélkül a választást követő két időpontban (az ivarzás kezdetét követő 30-31. és 36-37. órában) két különböző termékenyítési adaggal (1×10^9 és 2×10^9 sp./term. adag) végeztek AI-eket, amelyeket a petefészkek ultrahangos ellenőrzésével kapcsoltak össze. A periovulációs időszakban végrehajtott egyszeri AI-vel (1×10^9 sp./term. adag) szignifikánsan magasabb lett a vemhesülési arány és a összes malac/alom száma, ellentétben a prae- és postovulációs időszakban végzett AI-vel. Habár a pre- és a postovulációs időszakban vézett kétszeri AI-k (2×10^9 sp./term. adag) javították a szaporodásbiológiai mutatókat, de nem voltak hatással a periovulációs időszakban végrehajtott termékenyítések eredményeire.

Wongtawan et al. (2006) az egyszeri AI adagot tartalmazó (1×10^9) 0,7 ml-es MiniFlatPack-kel és 0,5 ml szalmával DUI termékenyítéseket végeztek ovuláció indukció nélkül. A felovasztás követően a termékenyítési adagokat – korábbi DUI-t alkalmazó AI-vel szemben - nem hígították tovább. Habár DUI-val és a kontrollként alkalmazott 0,5 ml-es szalmával elért vemhesülési arány alacsony (31,8% és 40,0%) volt, azonban az ilyen kis térfogatban koncentrált AI adagok is adhatnak ígéretesnek tűnő vemhesüléseket. További megerősítést nyert az a korábbi megfigyelés is, hogy jobb és elfogadható vemhesülési arány eléréséhez az AI-eket az ovulációhoz legközelebbi időpontban kell végrehajtani. A legjobb vemhesülési arány (60%) az ovuláció előtti 4–8 órán belül elvégzett AI-nél volt megfigyelhető.

Hasonló termékenyítési protokollt alkalmaztak Buranaamnuay et al. (2010), akik 0,5 ml-es szalmában FT termékenyítési adagokat (1×10^9 sp./term. adag) használtak fel DUI-val spontán és ovuláció indukált (hCG) kocákban. A spontán ovuláló kocák termékenyítése 12 óras időközzel történt egészen az ovulációig, amíg a hCG kezelt kocacsoportban ez rögzített idejű volt: 36, 42 és/vagy 48 órával az injekciót követően. Csak az ivarzás hossza volt szignifikánsan rövidebb a hormonnal kezelt csoportban, de a fialási arányban és a malac/alom számban nem volt szignifikáns különbség a vizsgálati csoportok között. Az eredmények azt mutatták, hogy bizonyos rendszerességgel az ovulációig folytatott alacsony sejtszámmal végzett AI-vel is – az ovulációindukció alkalmazása nélkül – azonos szaporodásbiológiai eredmények érhetők el.

A mélyfagyasztás eredményessége nem csak az alábbiaktól függ, mivel jelentős különbséget figyeltek meg a fajták között, a kanok között, az egy kantól származó különböző ejakulátumok mélyfagyaszthatóságában is. Ez alapján az ondókat „jól”, „közepesen” vagy „rosszul” mélyfagyaszthatóknak lehetett minősíteni. Gil et al. (2005) szerint az FT ondókat egyes in vitro

tulajdonságai alapján (pl. petesejt penetráció) sorolhatók a „jól” és a „rosszul” mélyfagyasztathatók csoportjába. Hasonló megfigyelésre jutottak Casas et al. (2010), akik a „jól” és „rosszul” mélyfagyasztatható kanok között a progresszív mozgásban és a sejtmembránok érintettségében véltek különbséget felfedezni. Ez az in vitro eredményekben megfigyelt szignifikáns különbség a vemhesülési és a fialási arányban is megmutatkozott, de az összes malac/alom számban már nem. Ezen megfigyelések újabb magyarázatot adhatnak arra a ma már széles körben elfogadott megfigyelésre, hogy az FT sertésondó alacsonyabb és változatos termelési eredménye „kan függő” is lehet.

Az in vitro és in vivo kísérletek során szerzett eredményekből számos, a felhasználás sikerességét befolyásoló következtetés vonható le. A fogamzás egyik alapvető feltétele, hogy az ovulációkat megelőzően kellő számú és megtermékenyítésre képes spermium álljon rendelkezésre a petevezetőben. Ennek a térben és időben való szinkronizációnak a megvalósítása a sertés FT spermiumokkal kapcsolatban több szempontból is különösen nehéz. Ez adódik abból, hogy az FT hímvarsejtek – ellentétben a frissen hűtött hímvarsejtekkel – rövidebb ideig (kb. 2-8 óra) élnek túl a női nemi utakban és kisebb mértékben képesek a petevezető nyálkahártyájához kapcsolódva funkcionális spermaraktárt kialakítani (Fazeli et al., 1999). Napjainkban a mélyfagyasztás és az AI számos olyan módosított formájával rendelkezünk, amelyek telepi körülmények között is egyszerű felhasználást és elfogadható termelési eredményeket biztosít (1. táblázat). A változtatások kisebb része a mélyfagyasztási, a többsége az AI technológiai módosítására törekszik. Ennek az lehet az oka, hogy a sertés hímvarsejteket ért károsodások olyan sokrétűek, hogy azok csökkentése és teljes kivédése egy-egy mélyfagyasztás technológiai lépés megváltoztatásával nem vagy csak nagyon nehezen lehetséges. Mindezt tovább nehezíti, hogy nem csak az egyes kanok, hanem egy kan ejakulátumai között is jelentős eltérések lehetnek a mélyfagyasztás szempontjából (Gil et al., 2005). Az 5 ml-es FlatPack azon kevés számú újítás közé tartozik, amely mindazon túl, hogy a hímvarsejteknek kedvezőbb termodinamikai feltételt biztosít, megfelel az „egy csomag egy AI adag” elvárásnak. Telepi körülmények között jelentős segítség lehet, ha egy AI adagot egy csomag kiolvasztásával, nem pedig több szalma tárolásával és kezelésével lehet biztosítani (Eriksson et al., 2002). Mindezek ellenére a telepi termékenyítések során a 0,5 ml-es szalma alkalmazása terjedt el nagyobb mértékben. Feltehetően azért, mert már egy szalmában – különösen a DUI-t alkalmazó termékenyítések esetén – is biztosítható a termékenyülésekhez szükséges sejtszám (Wongtawan et al., 2006). Az egy AI adagban használt sejtszám nem csak a megfelelő vemhesülési arány és alomszám eléréséhez szükséges, hanem az ondó mélyhűtés gazdaságosságát is érinti. Minél alacsonyabb sejtszámmal lehet elérni elfogadható

eredményeket, annál nagyobb számú AI adagot lehet egy mélyfagyasztással egy apaállattól előállítani. Jelenlegi tapasztalatok szerint DUI-val és/vagy hormonális kezeléssel az egy AI adagban szükséges legalacsonyabb sejtszám 1×10^9 .

Az FT ondó alkalmazásához az igazi lendületet, azok a termékenyítő katéter típusok adták, amelyekkel a felovasztott ondót a méh különböző mélységeibe, a megtermékenyítés helyszínéhez a lehető legközelebb lehetett eljuttatni DUI-val (Martinez et al., 2002) vagy UI-val (Gil et al., 2004; Casas et al., 2010). Ezekkel a termékenyítő katéterekkel csökkenteni lehetett azt a távolságot, amit a hagyományos cervikális termékenyítés során a spermiumoknak meg kellett tenniük. A DUI hátránya, hogy az egyszeri „vakon” végzett katéter bevezetéssel csak az egyik oldali méhszarvba lehet az AI anyagot bejuttatni, azonban kétszeri AI-vel – igaz fennáll az ellenoldali termékenyítés lehetősége – sem lehet kizárni ugyan annak a méhszarvnak az ismételt termékenyítését. Mindezek alapján azt gondolhatnánk, hogy az egyoldali AI-nek köszönhetően az ellenoldali petesejtek megtermékenyítése teljesen kizárt. Erre rációznak azok a megfigyelések, amelyek során a spermiumok ellenoldali méhszarvba való – igaz kisebb mértékű – inrauterinális vándorlását igazolták (Brüssow et al., 2011). Továbbá az egyszeri vagy kétszeri DUI során nem volt különbség a megtermékenyített petesejtek számában, ami felhívja a figyelmet arra, hogy nem csak az AI-k száma, hanem egyéb faktorok is fontos szerepet játszhatnak a megtermékenyülésben. Ezek között találjuk az AI-k és az ovulációk között eltelt időtartamot. A női nemi utakban rövid túlélésre képes FS spermiumoknak nagyon szűk időintervallum áll rendelkezésre a megtermékenyítéshez. A legjobb vemhesülések akkor érhetők el, ha az ovulációt megelőző 4-0 és 8-4 órában kerülnek sorra az AI-k (Waberski et al., 1994; Bolarin et al., 2006). Ennek az időintervallumnak a telepi körülmények között való pontos meghatározása – függetlenül a termékenyítések formáitól – nagyon nehéz, ezért az ivarzások pontos és precíz ellenőrzése elkerülhetetlen. Más állatfajokkal ellentétben nem áll rendelkezésünkre más az ovuláció idejét előrejelző eszköz, mint az ivarzások kezdete, ennek követése és rögzítése, amelyet az ivarzás kezdetétől számított fix időben végrehajtott AI-k vagy az ovuláció mesterséges indukciója (hCG) követ. Az ovuláció indukció alkalmazása elsősorban nem a jelentősen nagyobb vemhesülési, fialási arányban és az alomszámban nyilvánul meg, hanem az AI-k számát, a kocák ivarzásának a hosszát, a kocák ivarzásai és az alomszámai közötti különbségeket lehet csökkenteni (Buranaamnuay et al., 2010). Az ivarzások egységesebb időtartama növeli az AI-k biztonságát és tervezhetőbbé teszi a napi munkát.

Az eddigi sertés mélyfagyasztott ondóval kapcsolatos in vitro és in vivo kísérlete során szerzett sokrétű eredmény és tapasztalat adott kellő alapot ahhoz, hogy egy új innovációt alkalmazzunk a sertésondó mélyfagyasztási technológiájában.

1 1. táblázat. Telepi körülmények között mélyfagyasztott sertésodót alkalmazó mesterséges termékenyítések összefoglalása.

| Spermium/AI adag (x10 ⁹) | Csomagolás (ml) | Mélyfagyasztás formája | AI száma | Ivarzás/ovuláció indukció | AI típusa | Fialási arány (%) | Összes alomszám | Irodalom |
|--------------------------------------|-----------------|------------------------|----------|---------------------------|-----------|-------------------|-----------------|---------------------------|
| 5 | 5 (FlatPack) | PR | 2 | - | n.a. | 73 | 10,7±3.6 | Eriksson et al., 2002 |
| 1 | | | 1 | | DUI | 77 | 9,3±0.4 | |
| 6 | 0,5 | PR | 1 | eCG/hCG | CAI | 75 | 9,6±0,5 | Roca et al., 2003 |
| 1 | | | 2 | - | DUI | 70 | 9,2±0.2 | |
| 1 | | | | | | 53 | 9,1±0,3 | |
| 2 | | | | | | 70 | 9,3±0,3 | |
| 1 | 0,5 | PR | 2 | - | DUI | 70 | 9,1±0,2 | Bolarin et al., 2006 |
| 1 | | | | | | 51 | 9,0±0,3 | |
| 2 | 0,5 | PR | 2-3 | - | UI | 75 | 10,5±0,4 | Fraser et al., 2007 |
| 1 | 0,5 | PR | 2 | - | DUI | 47 | 9,1±0,3 | Bathgate et al., 2008 |
| 1 | 0,5 | LN ₂ | 3 | - | DUI | 60 | 8,0±2,8 | Buranaamnuay et al., 2010 |
| | | | 2 | | | 65 | 9,4±3,7 | |
| 7,5 | 0,5 | PR | 2 | - | UI | 53 | 9,3±1,1 | Casas et al., 2010 |
| 2 | 0,5 | PR | 3 | - | CAI | 78 | 12,5±3,9 | Didion et al., 2013 |

2 AI: mesterséges termékenyítés, CAI: cervikális mesterséges termékenyítés, UI: inrauterin termékenyítés, DUI: mély inrauterin termékenyítés, PR:

3 programozott mélyfagyasztás, LN₂: mélyfagyasztás nitrogén gőzben, eCG: equine chorion gonadotropin, hCG: humán chorion gonadotropin

3.3. A stressz és a hidrosztatikai nyomás (HP) kapcsolata

A szubletális stressz ideiglenes javító és további stressz hatásokkal szembeni nem specifikus ellenálló képességet fokozó hatását az élet valamennyi területén – a baktériumoktól a többsejtű élőlényeken keresztül, beleértve az embert is – megfigyelték. Amikor egy élő szervezetet valamilyen speciális inger ér, arra meghatározott módon reagál és beindul a szervezet részéről egy vészreakció, melyet a vegetatív idegrendszer szimpatikus része irányít. Ez a bonyolult és összefüggő reakció a szervezet védekezésének szolgálatában áll és lehetőséget teremt a harcra vagy a menekülésre ("fight or flight"). Selye (1936) – miközben egy specifikus hormonhatást próbált analizálni – azt figyelte meg, hogy akármi is "támadja meg" a szervezetet az általános, egységes választ vált ki és a szervezet mindig ugyanazt a mechanizmust indítja be. Ez a reakció, amely vagy leküzdözi a veszélyeztető hatást, vagy nem, de semmiképpen sem tartható fenn sokáig. Ha az inger továbbra is fennáll, akkor egy adaptációs (rezisztencia) fázis alakul ki, vagyis a szervezet igyekszik alkalmazkodni a megváltozott körülményekhez. Ha a külső hatás nagyon tartós, akkor a védekezési mechanizmus kimerül (ez a harmadik fázis) és az egyed el is pusztulhat. Selye a provokáló tényezőket stresszoroknak, az állapotot stressznek nevezte el. A háromfázisú rendszer, amely a védekezési mechanizmusban részt vesz, az úgynevezett általános adaptációs szindróma (<http://www.termesztvilaga.hu>). A stressz a sejtek szintjén is képes érzékelést, értékelést majd ellenállást kiváltani, ami a sejtek ideiglenes ellenálló képességének növekedéséhez járul hozzá (Kültz, 2005). A stresszel szembeni válaszreakciókban kulcsfontosságú szerepet betöltő fehérjék a sejtekben konzervált állapotban vannak, de stressz hatására részt vesznek egyéb fehérjék, a DNS, a kromatin és a cytoskeleton stabilizációjában, kijavítják a redox folyamatokat, az energiatermelést, a lipid metabolizmust és eltávolítják a sérült fehérjéket (Kültz, 2003). Az olyan mértékű stresszt, amely a sejtfunkciók sérülése nélkül serkentő, pozitív hatással bír, azt úgynevezett eustressznek is hívhatjuk (Selye, 1975). Az ondókezelés lépései a spermiumok ért stresszhatások sorozatából áll: a hőmérséklet- és pH-változás, a hígítás, a centrifugálás során megemelkedett centrifugális erő, az ozmotikus nyomás, a hígítók toxikus összetevőik stb., azonban ezen stresszhatások többsége nem kontrollált úton képes befolyásolni a sejtfunkciókat.

A nyomást, mint termodinamikai jelenséget nagyon széles körben és nagy sikerrel alkalmazza a fizika, a hidrometallurgia, a geokémia és a biológia. Valamennyi alkalmazási terület a nyomásnak a természetben megfigyelhető hatásait próbálja kiaknázni és felhasználni (a gázok és a folyadékok összenyomhatóak, az ércekből ásványi anyagok keletkeznek, növekszik a mélytengeri baktériumok túlélése stb.). A HP az elmúlt évszázadban az egyik legjelentősebb tudományos felfedezés és alkalmazás volt a biológia területén. Ellentétben más fizikai

hatásokkal jelentősen alacsonyabb energiát közvetít, amivel a legnagyobb mértékben sikerült megőrizni az élelmiszerek élvezeti értékét a kórokozó baktériumok többségének az elpusztításával. Ez a HP széles körű felhasználásához vezetett az élelmiszeriparban a 20. század végén, de különösen nagy lendületet adott a különböző sterilizációs technológiák fejlődéséhez. Habár a HP legfőbb alkalmazási területe napjainkban továbbra is változatlan, azonban egyre több tanulmány foglalkozik az orvosi alap és alkalmazott kutatások területén a HP előnyös hatásainak a vizsgálatával és felhasználásának további lehetőségeivel (Demazeau & Rivalain 2011). A kísérleteink során a HP-t alkalmaztuk mi is stresszhatás kiváltására. A HP indukált stressz a kezelt minta valamennyi pontján azonnal hat, hatásának mértéke a mintán belül egységes, nem rendelkezik penetrációs problémákkal, a legfinomabban kontrollálható és szabályozható hatás a környezeti stresszhatások között. Hatása azonnal kialakítható, nem igényel hosszú időt és hatása azonnal megszűnik, amennyiben a minta ismét a légköri nyomásra kerül vissza (Pribenszky et al., 2010; Pribenszky et al., 2011).

Kísérleteink során feltételeztük, hogy a HP által kiváltott stressz alkalmazásával a sertés spermiumok ellenállóképessége növelhető a mélyfagyasztás károsító hatásával szemben, ami jobb termékenyítő képességet eredményez.

4. Anyag és módszer

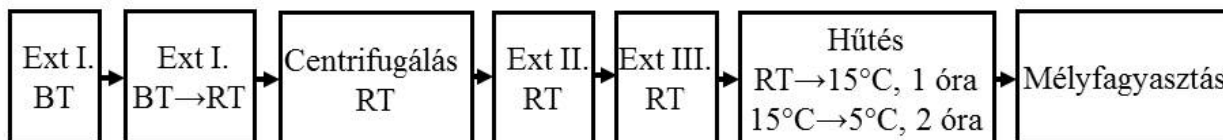
4.1. Állatok

Az ondókat a Felsőbabádi Zrt. sertéstelepén (Ócsa-Felsőbabád) tartott tizenhárom sertés kantól (Magyar nagyfehér, Magyar lapály, Hungahib, Dalland, kor: $25,5 \pm 5,2$ hónap) gyűjtöttük. Az állatokat tartása és takarmányozása – a telepen alkalmazott általános gyakorlatnak megfelelően – egyedi bokszos volt. Az ondóvételekre – alkalmanként 2-3 kantól – átlagosan heti kétszer alkalommal került sor. A kísérleti napok kivételével a kanokat a telep mesterséges termékenyítési programjában használták.

Az in vivo kísérleteinket a mesterséges termékenyítéseket a Győzelem Mezőgazdasági Szövetkezet lajoskomáromi sertéstelepén (kb. 1000 tenyészkoca, Lapály x Nagyfehér) végeztük. A kocák automata-szellőztető és légkondicionáló rendszerrel felszerelt termekben, egyedi állásokban kerültek elhelyezésre. A kocák takarmányozása számított fejadag alapján napi három alkalommal történt, az ivóvízellátásuk ad libitum volt.

4.2. Mélyfagyasztás

Az ondókat a spermavételt követően testhőmérsékletre (BT; 35°C) előmelegített Piglet Standard hígítóval (Ext.I., Piglet Plusz 2004 Bt.) 1:3 (v/v) arányban hígítottuk. Az egyes ejakulátumokat nem kevertük, valamennyit egyedi mintaként dolgoztuk fel. A hígított ejakulátumokat – kb. 2-3 órán belül – temperált spermaszállító konténerben a további feldolgozás céljából laboratóriumba szállítottuk (Szent István Egyetem, Állatorvos-tudományi Kar, Haszonállat-gyógyászati Tanszék és Klinika, Andrológiai Laboratórium, Dóramajor, Üllő), ahol az aktuális szobahőmérsékletre (RT; 23-27 °C) hűltek le. A 70%-nál nagyobb összes mozgással (TM%) és 80%-nál nagyobb rendes morfológiával rendelkező minták kerültek csak további feldolgozásra. Az ejakulátumok kezelése és mélyfagyasztása Westendorf et al. (1975) által kidolgozott protokollt követte kisebb módosításokkal. A hígított ondókat centrifugáltuk (RT, 2400 g/3 perc) (Carvajal et al., 2004), majd a felülúszót elöntöttük és a visszamaradó pelletet tovább hígítottuk Ext.II. hígítóval RT-n (80 ml 11% laktóz + 20 ml tojássárgája). Ezt az 1:2 arányú (v/v) hígítás – 2 rész Ext.II.-vel hígított minta + 1 rész Ext.III. hígító (89,5 ml Ext.II. + 9 ml glicerin + 1,5 ml Equex Paste (Nova Chemicals Sales, Inc., Scituate, MA)) – követte. A spermiumok végső koncentrációja 1×10^9 spermium/ml volt, amelyet Makler kamrával (Sefi Medical Instruments, Haifa, Israel) ellenőriztünk. Ezt követően a sperma mintákat 0,5 ml-es műszalmába töltöttük (IMV, L'Aigle, France), amelyeket ultrahangos készülékkel zártunk (MTG Ltd., Altdorf, Germany). A műszalmákat vízszintesen mélyfagyasztó tálcákra, majd hűthető termosztátba (Memmert Ltd., Schwabach, Germany) helyeztük. A hűtés első szakaszában 1 óra alatt RT-ről 15 °C-ra, majd további 2 óra alatt 5 °C-ra hűtöttük. Ezt követően a műszalmákat 20 percig 4 cm-rel a folyékony nitrogén (-196 °C) felett tároltuk, majd a folyékony nitrogénbe helyeztük, ahol a további in vitro vizsgálatokig vagy in vivo felhasználásig tároltuk (1. ábra). Az alábbiakban részletezett mélyfagyasztási protokollt alkalmaztuk minden kísérletünkben azzal a különbséggel, hogy a különböző kísérleti elrendezéseknek megfelelően hidrosztatikai nyomással kiváltott stresszkezelést (HP) illesztettünk a mélyfagyasztás különböző lépéseibe (ld. 4.3. Kísérleti elrendezések fejezet).

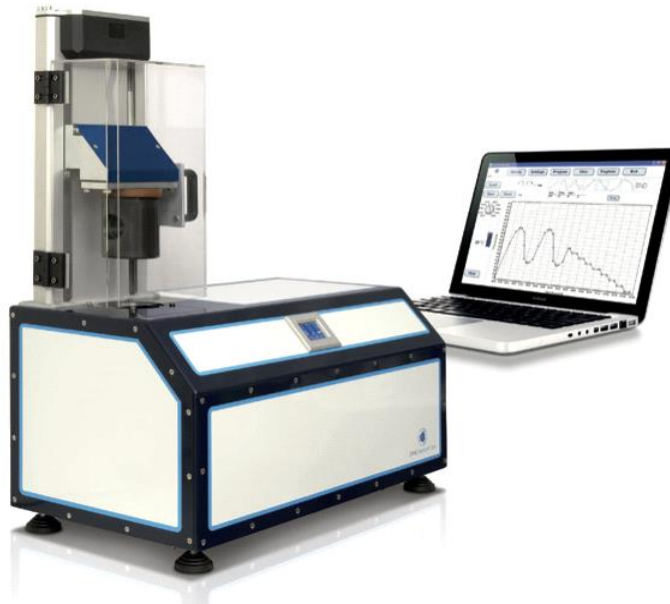


1. ábra. A sertésondók mélyfagyasztási protokolljának főbb lépései.

BT: testhőmérséklet, RT: szobahőmérséklet, Ext.: hígító

4.3. Kísérleti elrendezések

A HP kezeléseket egy számítógép vezérelt nyomáskamrával (HHP1400, ARTechnic Kft., Debrecen) végeztük (2. ábra). A egyben fűthető nyomáskamra rozsdamentes (KO 33) terében nyomóközegként desztillált vizet alkalmaztunk. A nyomást egy a kamrával összeépített munkahenger biztosította, amelynek az elmozdulása során nyomást alakított ki a nyomóközegben és a benne elhelyezett anyagokban. Az ejakulátum mintákat buborékmetesen – a minta mennyiségétől függően – 10, 20 vagy 50 ml műanyag Luer lock végű fecskendőbe vagy műanyag infúziós zsákokba töltöttük. A tároló formákat Luer lock dugóval zártuk, hogy elkerüljük a nyomóközeggel való érintkezést. A fecskendők és az infúziós zsákok rugalmas fala biztosította a nyomás átadását. A munkahenger mozgását egy számítógépre telepített szoftver irányította, amely 1-100 MPa közötti nyomás kialakítására vagy épp megszüntetésére volt képes 20 MPa/perc sebességgel.



2. ábra. A magas hidrosztatikai nyomás (1-100 MPa) létrehozása számítógép vezérelt nyomáskamrával.

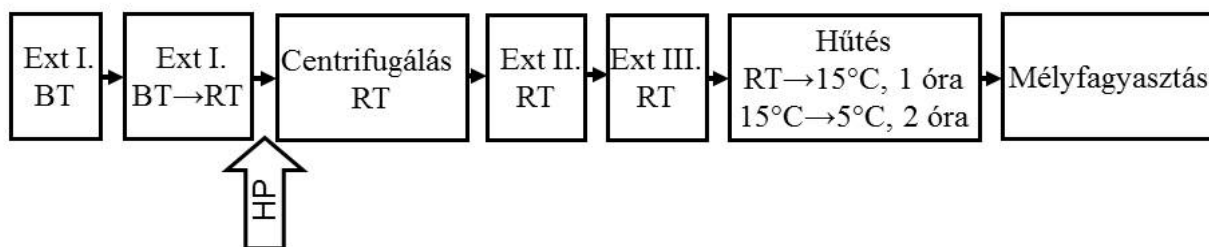
Az 1. kísérletben 8 kantól 3 alkalommal gyűjtöttünk ondót ($n=24$). A kísérletünk célja az volt, hogy megvizsgáljuk a különböző HP kezeléseknél (nyomás:idő) az ondókezelés során és a mélyfagyasztást követően a spermiumok mozgására kifejtett hatását. Minden egyes ejakulátumot az Ext.I. hígítást követően három atmoszférikus nyomáson tárolt kontroll (ATM) és kilenc HP kezelt kísérleti csoportra osztottuk. A HP kísérleti csoportok az Ext.I. hígítást követően RT-n HP kezelésben részesültek, miközben az ATM-eket azonos ideig RT-n tároltuk (2. táblázat).

2. táblázat. Az ejakulátumokból kialakított kísérleti csoportok (nyomás:idő kombinációk).

ATM: atmoszférikus nyomáson tárolt kontroll csoport, HP: hidrosztatikai nyomással stresszkezelt csoport

| | | Idő (perc) | | |
|--------------|-----|------------|----|-----|
| | | 40 | 80 | 120 |
| Nyomás (MPa) | ATM | - | - | - |
| | 20 | HP | HP | HP |
| | 40 | HP | HP | HP |
| | 80 | HP | HP | HP |

A HP kezeléseket követően a kísérleti csoportokat azonos módon mélyfagyasztottuk (3. ábra). Három alkalommal vizsgáltuk a spermiumok összes mozgását (TM%) és progresszív mozgását (PM%): közvetlen a HP kezelése után, az 5°C-os inkubációt és a mélyfagyasztást követően.

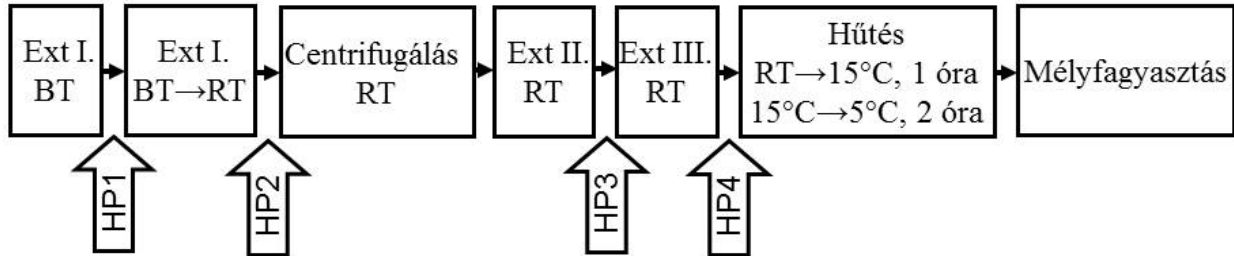


3. ábra. A különböző HP kezelése alkalmazása az 1. in vitro kísérlet mélyfagyasztási protokolljában.

BT: testhőmérséklet, RT: szobahőmérséklet, Ext.: hígító, HP: hidrosztatikai nyomással kiváltott stresszkezelés

A 2. kísérletben 13 kantól 3 alkalommal ejakulátumokat gyűjtöttünk (n=39). A kísérletünk célja az volt, hogy az 1. kísérletben a legnagyobb javító hatást adó és a spermakezelés különböző lépéseiben alkalmazott HP kezelés (40MPa:80 perc) hatását vizsgáljuk a spermiumok mélyfagyasztás utáni in vitro paramétereire (TM%, PM% és a sejtmembránok). Az egyes ejakulátumokból 1 ATM és 4 HP kezelt kísérleti csoportot hoztunk létre, ahol az egyes HP kísérleti csoportokat egy alkalommal a sperma kezelés különböző fázisaiban HP-vel kezeltük – HP1: ondóvételt követő hígítás (Ext.I.) után testhőmérsékleten (BT), HP2: ondóvételt követő hígítás (Ext.I.) után RT-n, HP3: a centrifugálást követő visszahígítás (Ext.II.) után RT-n és HP4:

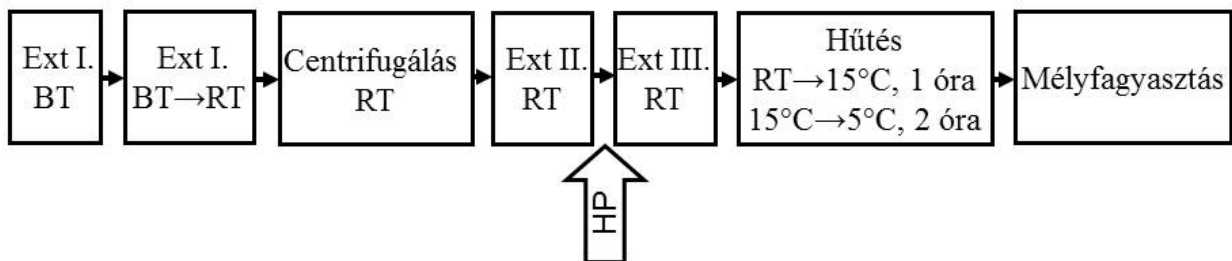
a mélyfagyasztásos hígítóval való hígítás (Ext.III.) után RT-n –, miközben a kontroll mintákat ATM-n tároltuk (4. ábra).



4. ábra. Az egyszeri HP kezelések (40MPa:80 perc) alkalmazásai a 2. in vitro kísérlet mélyfagyasztási protokolljaiban.

BT: testhőmérséklet, RT: szobahőmérséklet, Ext.: hígító, HP: hidrosztatikai nyomással kiváltott stresszkezelés

A 3. kísérletben 4 kantól (9-15 ejakulátum/kan) gyűjtöttünk ondót (n=49) (3. táblázat). A kísérletünk célja az volt, hogy az 2. kísérletben a legnagyobb javító hatást adó HP stresszkezeléssel (HP3: 40MPa:80 perc, Ext.II. után, RT-n) a mesterséges termékenyítés számára termékenyítő adagokat készítsünk és vizsgáljuk a spermiumok mélyfagyasztás utáni in vitro paramétereit (TM%, PM%) és a szaporodásbiológiai eredményekkel való kapcsolatát. Az ejakulátumokat az Ext.II. hígítást követően kontroll (C-FT) és HP kezelt (HP-FT) csoportra osztottuk. A HP-FT ejakulátumokat egy alkalommal RT-n (40MPa:80 perc) HP kezeltük, amíg a C-FT ejakulátumokat ATM-n és azonos RT-n tároltuk (5. ábra). Amennyiben egy ejakulátum HP-FT mintáiban a kiolvasztást követően a TM% alacsonyabb volt, mint 40, akkor az ejakulátumot AI-re alkalmatlannak minősítettük.



5. ábra. Az in vivo kísérlet HP kezelt termékenyítő adagjainak mélyfagyasztási protokollja.

BT: testhőmérséklet, RT: szobahőmérséklet, Ext.: hígító, HP: hidrosztatikai nyomással kiváltott stresszkezelés

3. táblázat. Az in vivo kísérletben mélyfagyasztott ejakulátumok megoszlása és a termékenyített kocák száma.

M: mélyfagyasztott ejakulátumok összes száma/kan; S: selejtezett ejakulátumok száma/kan (HP-FT TM%<40); A: MT-re alkalmasnak minősített ejakulátumok száma/kan (HP-FT TM%>40);

MT: MT-k során felhasznált ejakulátumok száma/kan

| Fajta* | M | S | A | MT | Termékenyített kocák száma |
|----------|----|---|----|----|----------------------------|
| HH1 | 9 | 1 | 8 | 6 | 22 |
| HH2 | 14 | 2 | 12 | 10 | 28 |
| ML | 11 | 1 | 10 | 8 | 24 |
| DL | 15 | 3 | 12 | 10 | 28 |
| Összesen | 49 | 7 | 42 | 34 | 102 |

*HH: Hungahib, ML: Magyar Lapály, DL: Dalland

4.4. In vitro vizsgálatok

4.4.1. Mozgás vizsgálata

A mélyfagyasztott ejakulátumok kontroll és kísérleti mintáiból 2-2 műszalmát olvasztottunk ki 37°C-os vízfürdőben 30 perc alatt. A motilitás vizsgálatokhoz szükséges koncentrációhoz (60 x10⁶ spermium/ml) a mintákat tovább hígítottuk Ext I.-gyel 1:15 (v/v) arányban és vízfürdőben inkubáltuk (37°C, 20 perc). A motilitás méréséhez fűthető tárgyasztallal felszerelt és negatív fáziskontraszt objektívvel (UPlan FINH 20X/0.5 Ph1, Olympus, Japan) ellátott mikroszkópot (Olympus BX30, Olympus, Japan) használtunk és az adatokat egy számítógép vezérelt spermaelemző szoftver (CASA) (SpermVision™ version 3.5, Minitube, Tiefenbach, Germany) értékelte. Minden mintából kettő csepp és minden csepről tíz terület vagy min. 2000 spermium került elemzésre. A mozgás típusainak értékeléséhez a CASA használati útmutatójában a sertés spermiumokra vonatkozó beállítási értékeket alkalmaztuk: nem mozgó: AOC (average orientation change)<2,5; TM%: AOC>2,5 és DSL (distance straight line)<4,5 µm/s; PM%: AOC>2,5 és DSL>4,5 µm/s.

4.4.2. Sejtmembránok vizsgálata

A sejtmembránok vizsgálatához a spermiumok külső membránjainak és az akroszóma membránjának az együttes vizsgálatára alkalmas festési módszert használtuk (Kovács & Foote, 1992). Az ejakulátum mintákat (2 műszalma/ejakulátum) a vízfürdőben olvasztottuk ki (37°C, 30

sec) és ezt követően Ext.I. hígítóval 1:15 (v/v) arányban hígítottuk, majd tovább inkubáltuk (37°C, 20 perc). Ezt követően egy 37°C-ra előmelegített tárgylemezen a vízfürdőben inkubált ejakulátumból és tömény Chicago kékből (Sigma C-6879, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) készített 0,2%-os izoozmotikus (300 mosmol/l) festékből azonos nagyságú cseppeket kevertünk össze. Ebből kenetet készítettünk, amit közel függőleges helyzetben RT-n száradni hagytunk. Ezt 4 perc fixálás (86 ml 1 N HCl + 14 ml 37% formaldehid oldat + 0,2 g neutral vörös (Sigma, N-2880)), csapvizet, majd desztillált vizes öblítés követett. A festés további lépésében a tárgylemezeket 7,5%-os Giemsa oldattal feltöltött festőkádákba helyeztük, amelyeket 3 órára 50°C-ra előmelegített vízfürdőbe állítottunk. Ezt követően újabb csap- és desztillált vizes öblítés, majd 2 perc desztillált vizes áztatás következett. A levegőn megszárított mintákat 100x immerziós objektív alatt fénymikroszkópban vizsgáltuk. A spermiumok vizsgálatához a hímivarsejt (n=200) különböző részeinek festődését vizsgáltuk és értékeltük (4. táblázat):

4. táblázat. A sejtmembránok értékelése a spermiumok fej, az akroszóma és a fark területének festődése alapján.

| Sejtmembránok | Élő | | Holt |
|---------------|------------------------------|------------------------------|--------------------------|
| Fej | fehér vagy világos rózsaszín | | fekete vagy szürke |
| Farok | rózsaszín | | fekete vagy sötét ibolya |
| | Ép | Sérült | Hiányzó |
| Akroszóma | lila | sötét vagy világos levendula | fehér |

4.5. Mesterséges termékenyítés

A kocákat hetenkénti rendszerességgel csütörtöki napon választották és a kocaszálláson egyedi állásokba helyezték. Az ivarzások megfigyelése kereső kanokkal és a lovagló próba alkalmazásával a választást követő 3. napon kezdődött, naponta 2 alkalommal. Az in vivo kísérletünkben csak a választást követő 4. nap délutánján elsőként álló ivarzást mutató kocákat vontuk be, amelyeket az a választást követő 5. napon (kedd), két alkalommal mesterségesen termékenyítettünk. Összesen 10 alkalommal, alkalomként 8, 10, és 12 kocából véletlenszerűen termékenyítési párokat (n=51) alakítottunk ki, ahol a párból egyik kocát a kontroll (C-FT) a másik kocát a kezelt kísérleti csoportba (HP-FT) soroltuk (3. táblázat). A kialakított termékenyítési csoportok között nem volt szignifikáns ($P > 0,05$) különbség a kocák korábbi – FS spermát felhasználó AI-vel elért – vemhességeik ($3,6 \pm 1,4$ vs. $3,6 \pm 1,5$), az összes malac/alom ($12,3 \pm 3,1$ vs. $13,0 \pm 3,2$) és az összes élő malac/alom ($11,2 \pm 2,9$ vs. $11,2 \pm 3,1$) számában. Egy

termékenyítési adagban 12 műszalmát használtunk, amely termékenyítési adagonként összesen 6×10^9 sejtszámot jelentett. A műszalmákat előmelegített (37°C , 30 perc) vízfürdőben olvasztottuk ki, majd – hasonló körülmények között előmelegített és tartott – műanyag mesterséges termékenyítő flakonokban töltöttük és 80 ml Ext I.-gyel hígítottuk. Minden kocát két alkalommal mesterségesen termékenyítettünk: az 1. AI a választást követő 5. napon reggel (06:00 és 08:00 óra között) – kb. 12 órával az első megfigyelt álló ivarzást követően –, a 2. AI aznap délután kb. 10 órával az 1. AI-t követően. Az AI-eket minden esetben azonos személyek végezték, akik számára ismeretlen volt a termékenyítő adagok eredete (C-FT vagy HP-FT). Az AI-hez a telepi gyakorlatnak megfelelően – elősíkosított szivacsos végű, hagyományos cevikális termékenyítő katétert (Schippers Export BV, Bladel, Netherlands) használtunk hormonális kezelések nélkül.

4.6. Vemhességi vizsgálat és adatgyűjtés

Az adatgyűjtés – a mesterséges termékenyítéseket (0. nap) követő 19. napon – a várható visszaivarzás megfigyelésével kezdődött. Ezt követte a 28. és 33. nap között végzett vemhességi ultrahangvizsgálat (AgroScan, ECM, Angoulême, France). A fialásokat követően feljegyeztük a fialt kocák számát, a malacok almonkénti számát (összes és összes élő) és a malacok testtömegét. Az alacsony alomszámmal rendelkező kocák alól a malacokat a fialást követően azonnal dajkásítottuk (10-12 malac/alom mindkét kísérleti csoportban) a gazdaságosság és a közel azonos takarmányozási feltételek biztosítása érdekében. További almonkénti malacsám és testtömegmérésre került sor a választáskor (28. nap) és ezt követő 14 nap múlva (42. nap).

4.7. Statisztika

Az 1. és 2. in vitro kísérlet hipotézisek tesztelésére általános lineáris kevert modelleket illesztettünk az adatokra, ahol az időpont és a kan (1. kísérlet) valamint a kan és az ejakulátum (2. kísérlet) random hatásként, a kezelést fix hatásként vettük figyelembe. A magyarázó változók a becsült TM%, PM% és a membrán integritás paraméterei voltak.

Az 1. kísérletben a nyomás (ATM, 20, 40 és 80 MPa), az idő (40, 80 és 120 perc), az 5°C -os inkubáció és ezek interakciói voltak a független fix faktorok. Az időpontoknál figyelembe vettük, hogy mely kantól származott a minta, mivel bizonyos napokon előfordult, hogy csak egy kantól vettünk mintát. A kanoknak köszönhető variancia elhanyagolható nagyságú volt, ezért a végső

modell kialakításánál a kanoknak köszönhető randomhatást kihagyhattuk. Többszörös összehasonlításokhoz az "fdr" korrekciót alkalmaztuk.

A 2. kísérletben a kezelés (40MPa:80perc) volt a fix hatás. A random hatásoknál figyelembe vettük, hogy az ejakulátum melyik kanhoz tartozik. Az ejakulátumoknak köszönhető variancia nagysága elhanyagolható mértékű volt, ezért a végső modell kialakításánál a hatását nem vettük figyelembe. Annak ellenére, hogy az adataink százalékértékek voltak, a hibatag és a random factor eloszlása normális eloszlást követett. A modellek illeszkedése rendben volt. Többszörös összehasonlításokhoz a Tukey-Kramer korrekciót alkalmaztuk.

A 3. kísérletünkben a Fisher's egzakt tesztet alkalmaztuk a vissza nem ivarzó kocák, a vemhességi arány és a fialási arány adatainak az elemzéséhez. A hipotézisek tesztelésére általános lineáris kevert modelleket illesztettünk az adatokra, ahol a kan és az ejakulátum random hatásként szerepelt (figyelembe vettük hogy melyik ejakulátum melyik kától származott). Magyarázó változóként a TM% és a PM% szolgált, fix hatásként pedig a C-FT és HP-FT csoportok, a vemhes vagy nem vemhes kocák, valamint ezek interakciói szerepeltek. Amikor az alom tulajdonságai szerepeltek magyarázó változóként (összes malac/alom, élő malac/alom, testtömeg/malac), akkor a C-FT és a HP-FT csoportok voltak a fix hatások (a levágott és nem vemhesült kocák nem szerepeltek az elemzésekben). A normalitást és a varianciák homogenitását a modell diagnosztikai ábrái alapján a reziduumok és a standard reziduumok segítségével néztük. A modellek illeszkedése rendben volt. Pearson-féle korrelációt alkalmaztuk a motilitás paraméterek (TM% és PM%) és a malac/alom közötti kapcsolat vizsgálatára.

Az adataink elemzéséhez a R statisztikai szoftvert alkalmaztuk. A szignifikancia szint 0,05 volt.

5. Eredmények

5.1. In vitro kísérletek

5.1.1. A HP kezelések hatása

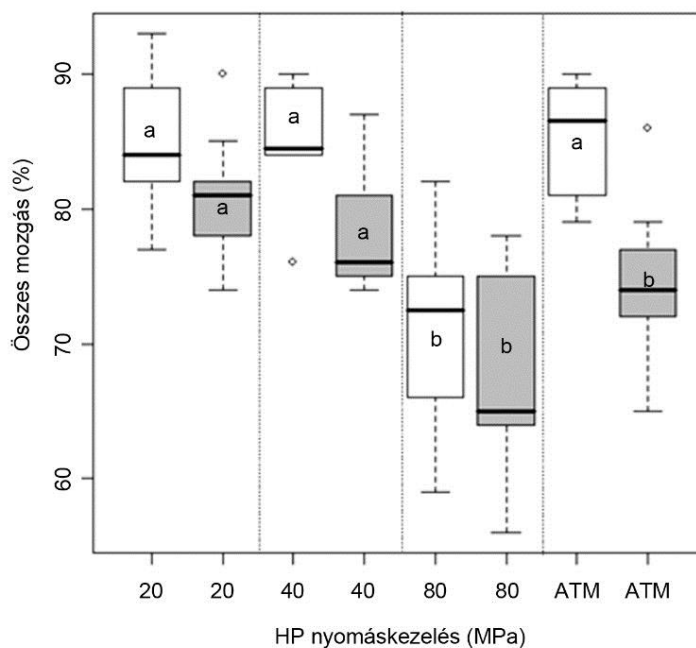
Az 1. in vitro kísérletünkben információt kaptunk arról, hogy a különböző HP kezeléseknek az időtartama nem, csak a nagysága van hatással a mélyfagyasztást megelőző ondókezelés egyes pontjain mért motilitási értékekre. A 80MPa kezelés már a mélyfagyasztást megelőző két mérési időpontban – a HP kezelést és az 5 °C-os egyensúlyos időszakot követően – szignifikánsan rontó hatással bírt a TM% ($P < 0,001$) és a PM%-ra ($P < 0,05$) az ATM (kontroll), a 20 és 40MPa kezelésekhez képest. Ha e két mérési pont közötti TM% változását figyeltük, akkor amíg az

ATM mintákban szignifikáns ($P < 0,05$) csökkenés mutatkozott, addig ezt az azonos körülmények között elvégzett 20 és 40MPa kezelések képesek voltak kivédeni. A PM%-ban ilyen jellegű különbség nem volt tapasztalható (5. és 6. táblázat, 6. és 7. ábra).

5. táblázat. A kísérleti csoportok TM% és PM% értékei közvetlen a HP kezelést követően (átlag (S.E.)).

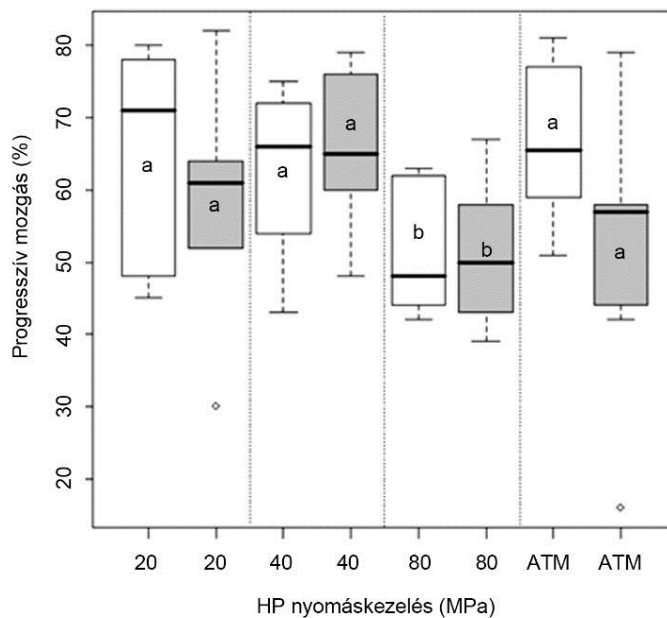
ATM: atmoszférikus nyomáson tárolt kontroll, TM%: összes mozgás, PM%: progresszív mozgás

| Nyomás (MPa) | Idő (perc) | | | | | |
|-----------------|------------|-------------|------------|-------------|------------|-------------|
| | 40 | | 80 | | 120 | |
| | TM% | PM% | TM% | PM% | TM% | PM% |
| ATM | 88,1 (2,2) | 70,3 (11,4) | 88,3 (1,8) | 61,4 (10,4) | 80,7 (1,4) | 68,5 (8,5) |
| 20 | 81,3 (4,2) | 71,5 (6,5) | 91,5 (2,5) | 61,2 (16,3) | 82,5 (0,5) | 64,6 (6,4) |
| 40 | 87,5 (3,4) | 73,4 (2,6) | 87,3 (2,4) | 52,8 (9,1) | 80,5 (4,8) | 63,9 (9,6) |
| 80 | 65,5 (6,5) | 48,2 (2,5) | 78,5 (3,5) | 53,5 (9,5) | 69,5 (3,5) | 52,1 (10,4) |



6. ábra. A HP kezelések hatása a TM%-ra a HP kezeléseket (fehér boxplot) és az 5 °C-os inkubációs időszakokat (szürke boxplot) követően.

A boxplottok eltérő indexei szignifikáns különbséget ($P < 0,05$) jelölnek



7. ábra. A HP kezelések hatása a PM%-ra a HP kezeléseket (fehér boxplot) és az 5 °C-os inkubációs időszakokat (szürke boxplot) követően.

A boxplotok eltérő indexei szignifikáns különbséget ($P < 0,05$) jelölnek

6. táblázat. A kísérleti csoportok TM% és PM% értékei az 5°C-os inkubációs időszakot követően (átlag (S.E.)).

ATM: atmoszférikus nyomáson tárolt kontroll, TM%: összes mozgás, PM%: progresszív mozgás

| Nyomás (MPa) | Idő (perc) | | | | | |
|-----------------|------------|-------------|------------|-------------|------------|------------|
| | 40 | | 80 | | 120 | |
| | TM% | PM% | TM% | PM% | TM% | PM% |
| ATM | 72,2 (2,5) | 47,7 (10,5) | 78,3 (4,1) | 60,1 (10,2) | 75,5 (4,4) | 45,5 (3,5) |
| 20 | 78,5 (1,6) | 51,2 (7,5) | 85,6 (2,3) | 71,3 (5,4) | 80,6 (2,0) | 56,5 (4,5) |
| 40 | 77,4 (1,5) | 63,2 (5,7) | 78,6 (4,1) | 64,1 (7,7) | 80,5 (4,5) | 74,4 (2,2) |
| 80 | 67,3 (4,5) | 46,7 (4,5) | 64,0 (0,5) | 47,3 (2,1) | 76,5 (1,5) | 66,3 (1,3) |

A mélyfagyasztást követően a TM% és PM% értékeire a nyomás nagyságán ($P < 0,001$) túl a nyomás ideje ($P < 0,05$) is szignifikáns hatással volt. A 20 és 40 MPa kezelésekkel szignifikánsan magasabb ($P < 0,05$) TM% és PM% értékeket lehetett elérni az ATM és a 80 MPa kezelésekhez képest (7. táblázat). A legmagasabb TM% érték a 40MPa:120perc kezeléssel lehetett elérni, azonban a legnagyobb mértékű javító hatás – az ATM mintákhoz képest – a 40MPa:80 perc kezeléssel adódott. Hasonló eredményt kaptunk a PM% esetében is, de a 40MPa:80 perc kezelés javító hatásának mértéke szignifikánsan nem különbözött ($P > 0,05$) a 40MPa:120 perc kombinációtól (8. és 9. táblázat).

7. táblázat. A kísérleti csoportok TM% és PM%-a mélyfagyasztást követően (átlag (S.E.)).

ATM: atmoszférikus nyomáson tárolt kontroll, TM%: összes mozgás, PM%: progresszív mozgás

| Nyomás (MPa) | Idő (perc) | | | | | |
|-----------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| | 40 | | 80 | | 120 | |
| | TM% | PM% | TM% | PM% | TM% | PM% |
| ATM | 30,6 (2,0) | 17,1 (1,1) | 23,2 (1,8) | 13,3 (0,7) | 41,8 (2,9) | 29,7 (3,0) |
| 20 | 38,8 (1,3) | 21,1 (2,6) | 43,2 (5,2) | 30,8 (4,3) | 51,5 (2,3) | 38,7 (3,9) |
| 40 | 38,8 (2,8) | 24,3 (2,3) | 42,2 (3,2) | 26,6 (3,0) | 55,5 (3,6) | 46,6 (3,3) |
| 80 | 29,5 (1,2) | 16,8 (1,1) | 23,2 (2,4) | 12,2 (1,6) | 48,3 (2,9) | 35,3 (1,5) |

8. táblázat. A mélyfagyasztást követően a különböző HP kezelési kombinációkhoz tartozó TM% és PM% becsült nagysága. A kiemelt kezelési kombinációk rendelkeznek a legnagyobb hatással.

ATM: atmoszférikus nyomáson tárolt kontroll, TM%: összes mozgás, PM%: progresszív mozgás

| | | TM % | PM% |
|--------------------------|---------------|-------------------------|-------------------------|
| | | becsült érték (S.E.) | becsült érték (S.E.) |
| Idő (perc) | 40 | 34,4 (2,0) ^b | 19,8 (2,1) ^a |
| | 80 | 32,1 (2,4) ^b | 20,7 (2,5) ^a |
| | 120 | 48,5 (2,2) ^a | 37,0 (2,5) ^b |
| Nyomás (MPa) | ATM | 32,0 (1,7) ^a | 21,1 (1,7) ^a |
| | 20 | 42,4 (1,6) ^b | 28,5 (1,7) ^b |
| | 40 | 44,6 (1,7) ^b | 31,5 (1,7) ^b |
| | 80 | 34,4 (1,8) ^a | 22,2 (1,7) ^a |
| Nyomás:Idő (MPa:perc) | ATM:40 | 31,2 (2,6) | 17,7 (2,4) |
| | 20:40 | 38,7 (2,5) | 20,0 (2,3) |
| | 40:40 | 38,8 (2,6) | 23,7 (2,4) |
| | 80:40 | 29,1 (2,6) | 17,3 (2,4) |
| | ATM:80 | 22,6 (3,1) | 13,8 (3,1) |
| | 20:80 | 38,0 (3,1) | 26,6 (3,1) |
| | 40:80 | 41,0 (3,1) | 27,6 (3,1) |
| | 80:80 | 27,1 (3,4) | 14,2 (3,4) |
| | ATM:120 | 41,9 (3,0) | 30,3 (3,4) |
| | 20:120 | 50,7 (3,0) | 38,3 (3,4) |
| | 40:120 | 54,8 (3,3) | 45,5 (3,7) |
| | 80:120 | 47,7 (3,3) | 35,3 (3,7) |

Az időhöz (perc) és a nyomáshoz (MPa) tartozó TM% és PM% értékek eltérő felső indexei szignifikáns különbséget ($P < 0,05$) jelölnek.

9. táblázat. A mélyfagyasztást követően a 40 MPa-on különböző időig HP kezelt és az ATM (kontroll) minták TM% és PM% értéke közötti becsült különbség.

TM%: összes mozgás, PM%: progresszív mozgás

| | Nyomási idő (perc) | Becsült különbség (S.E.) |
|-----|--------------------|--------------------------|
| TM% | 40 | 7,6 (2,7) ^a |
| | 80 | 18,4 (3,1) ^b |
| | 120 | 12,9 (3,6) ^c |
| PM% | 40 | 5,9 (2,0) ^a |
| | 80 | 13,8 (3,3) ^b |
| | 120 | 15,2 (4,2) ^b |

A TM% és PM%-hoz tartozó becsült különbségek eltérő felső indexei szignifikáns különbséget ($P < 0,05$) jelölnek.

5.1.2. A HP kezelés optimalizálása

A 2. in vitro kísérletünkben a HP2 és a HP3 csoportban a TM% szignifikánsan nagyobb ($P < 0,05$) volt az ATM (kontroll) csoportokhoz képest, de ezt a PM%-ban már nem lehetett megfigyelni. Az ép akroszóma, fej és farok membránnal rendelkező spermiumok aránya a HP3 csoportban volt a legmagasabb a kísérleti csoportok közül, de a különbség az ATM (kontroll) csoporthoz képest egyik esetben sem volt szignifikáns ($P > 0,05$) (10. táblázat).

10. táblázat. Az ondókezelés különböző lépéseiben HP-vel kezelt (40MPa:80perc) és az ATM (kontroll) kísérleti csoportok mélyfagyasztás utáni in vitro paramétereinek eredménye a csoportok közötti összehasonlítással (becsült különbség (S.D.)).

ATM: atmoszférikus nyomáson tárolt kontroll; hidrosztatikai nyomással kezelt csoportok (HP): HP1: ondóvételt követő hígítás (Ext.I.) után BT-n, HP2: ondóvételt követő hígítás (Ext.I.) után RT-n, HP3: a centrifugálást követő visszahígítás (Ext.II.) után RT-n és HP4: a mélyfagyasztásos hígítóval való hígítás (Ext.III.) után RT-n

TM%: összes mozgás, PM%: progresszív mozgás, * $P < 0,05$;

| Vizsgált csoportok | TM% | PM% | Ép akroszóma membrán% | Ép fej membrán% | Ép farok membrán% |
|--------------------|-------------|------------|-----------------------|-----------------|-------------------|
| HP2:ATM | 9,9 (3,4)* | 2,3 (2,2) | 1,9 (3,5) | 2,7 (3,7) | -3,6 (4,0) |
| HP3:ATM | 11,9 (3,4)* | 4,5 (2,2) | 9,0 (3,5) | 10,1(3,7) | 2,5 (4,0) |
| HP4:ATM | 5,5 (3,4) | 0,0 (2,2) | 4,9 (3,5) | 3,4 (3,7) | -3,5 (4,0) |
| HP1:ATM | 0,1 (3,5) | -3,2 (2,3) | -5,5 (3,6) | -2,8 (3,8) | -6,8 (4,0) |

5.2. In vivo kísérletek

5.2.1. Mélyfagyasztások eredményessége és felhasználása

A 49 mélyfagyasztott ejakulátumból 7 ejakulátumot (14,2%) a kiolvasztás utáni TM% alapján selejteztünk. Ezeknek az ejakulátumoknak a C-FT és HP-FT mintáiban is a TM% alacsonyabb volt mint 40. A további 42 ejakulátum (85,7%) valamennyi HP-FT mintáiban a TM% értéke meghaladta a 40-t, amíg ez a C-FT minták esetén csak 26 ejakulátumban volt mérhető, a maradék 16 ejakulátumban a TM% alacsonyabb volt mint 40. Ebből a 16 C-FT ejakulátumból – a 26 ejakulátum mellett, a termékenyíthető kocák limitált számának köszönhetően – 8-at használtunk fel AI-re, aminek a TM%-a 35,5-38,7 között változott (3. táblázat).

5.2.2. Szaporodásbiológiai (in vivo) eredmények

A HP-FT kocacsoportban a vissza nem ivarzó és az ultrahangos vemhességvizsgálattal vemhesnek diagnosztizált kocák aránya szignifikánsan ($P < 0,05$) magasabb volt, mint az ATM-n tárolt mélyfagyasztott ondóval termékenyített kontroll kocacsoportban (C-FT). A fialási arányban is számbeni növekedés (58,8 vs. 78,4%) volt, de a különbség nem volt szignifikáns ($P > 0,05$) (11. táblázat).

11. táblázat. A mesterséges termékenyítések – cervikális katéterrel, hormonális kezelések nélkül – szaporodásbiológiai eredményei a különböző mélyfagyasztott ondóval termékenyített kocacsoportokban.

C-FT: kontroll mélyfagyasztott ondó, HP-FT: hidrosztatikai nyomással kezelt mélyfagyasztott ondó

| | C-FT | HP-FT |
|--|------------------------|------------------------|
| Kocák száma a kísérleti csoportokban | 51 | 51 |
| Vissza nem ivarzó kocák száma a termékenyítést követő 19. és 28. nap között (%) | 33 (64,7) ^a | 44 (86,2) ^b |
| Vemhes kocák száma a termékenyítést követő 28. és 33. nap között elvégzett ultrahangos vizsgálat alapján (%) | 31 (60,8) ^a | 42 (82,3) ^b |
| Selejtezett vemhes kocák száma | 1 | 2 |
| Fialt kocák száma (%) | 30 (58,8) ^a | 40 (78,4) ^a |

A sorok eltérő felső indexei szignifikáns különbséget ($P < 0,05$) jelölnek.

A HP-FT kocacsoportban a vissza nem ivarzás közel három és félszer (Fisher teszt, $OR=3,3$), a vemhesülés háromszor (Fisher teszt, $OR=2,9$) és a fialás esélye két és félszer (Fisher teszt, $OR=2,5$) nagyobb volt, mint a C-FT kocacsoportban. A nem vemhesült kocák várható visszaivarzásának átlagos hossza a C-FT csoportban $24,0 \pm 3,4$; a HP-FT csoportban $24,0 \pm 2,0$ nap volt. Az ultrahangos vemhességvizsgálatot követően a C-FT csoportból egy vemhes koca sántaság miatt, a HP-FT csoportból két vemhes koca vetélés miatt selejtezésre került a vemhességük harmadik trimeszterében. Az összes malac/alom szignifikánsan magasabb ($P < 0,05$) volt a HP-FT csoportban, mint a C-FT csoportban. Hasonló szignifikáns különbség ($P < 0,05$) volt megfigyelhető az élő malac/alom számában is a két kísérleti kocacsoport között. Habár mindkét csoport malac/alom száma csökkent – kb. 15%-kal a fialástól a 42. napig –, azonban az élő malac/alom számában továbbra is megmaradt a szignifikáns különbség

($P < 0,05$) a HP-FT csoport javára. A malacok testtömegében sem a fialáskor, sem az ezt követő mérési időpontokban (28. és 42. nap) nem volt szignifikáns különbség ($P > 0,05$) (12. táblázat).

12. táblázat. A különböző mélyfagyasztott ondóval termékenyített – cervikális katéterrel, hormonális kezelések nélkül – kocacsoportok alomnagyságai és a malacok testtömegei (átlag (S.D.)).

C-FT: kontroll mélyfagyasztott ondó, HP-FT: hidrosztatikai nyomással kezelt mélyfagyasztott ondó

| | | C-FT | HP-FT |
|--|-----------------------|-------------------------|-------------------------|
| Fialás (0. nap) | Összes malac/alom | 8,0 (3,8) ^a | 10,8 (4,5) ^b |
| | Összes élő malac/alom | 7,3 (3,6) ^a | 9,4 (4,2) ^b |
| | Testtömeg/malac (kg) | 1,7 (4,7) ^a | 1,7 (3,7) ^a |
| Választás (28. nap) | Malac/alom | 6,4 (1,6) ^a | 8,0 (2,4) ^b |
| | Testtömeg/malac (kg) | 9,4 (1,1) ^a | 9,1 (0,8) ^a |
| 2 héttel a választás után (42. nap) | Malac/alom | 6,2 (1,2) ^a | 8,0 (2,4) ^b |
| | Testtömeg/malac (kg) | 13,3 (1,5) ^a | 13,2 (1,1) ^a |

A sorok eltérő felső indexei szignifikáns különbséget ($P < 0,05$) jelölnek.

5.3. In vitro és az in vivo eredmények közötti kapcsolat

Az AI során felhasznált FT ondók TM% és a PM% értéke szignifikánsan nagyobb ($P < 0,001$) volt a HP-FT csoportban mind a C-FT csoportban, azonban a mozgási paraméterekben nem találtunk szignifikáns különbséget ($P > 0,05$) az egyik kísérleti csoportban sem a vemhesült és a nem vemhesült kocák között (13. táblázat). További nem szignifikáns összefüggés (Pearson korrelációs együttható, $r = 0,11 - 0,20$; $P > 0,05$) volt megfigyelhető mind a két kísérleti csoportban (C-FT, H-FT) az összes malac/alom és a mozgási paraméterek között (TM%, PM%).

13. táblázat. A mélyfagyasztott ondók TM%, PM% értéke (átlag (S.D.)) és a szaporodásbiológiai eredmények kapcsolata.

C-FT: kontroll mélyfagyasztott ondó, HP-FT: hidrosztatikai nyomással kezelt mélyfagyasztott ondó, TM%: összes mozgás, PM%: progresszív mozgás

| Kísérleti csoportok | | TM% | PM% |
|---------------------|------------|--------------------------|-------------------------|
| C-FT | | 43,7 (8,0) ^a | 18,9 (5,9) ^c |
| HP-FT | | 60,2 (11,5) ^b | 25,6 (6,7) ^d |
| C-FT | vemhes | 43,8 (7,4) ^a | 18,6 (6,2) ^b |
| | nem vemhes | 43,6 (9,0) ^a | 19,3 (5,5) ^b |
| HP-FT | vemhes | 61,3 (11,6) ^a | 25,8 (7,1) ^b |
| | nem vemhes | 54,7 (9,8) ^a | 24,4 (4,3) ^b |

A sorok eltérő felső indexei szignifikáns különbséget ($P < 0,001$) jelölnek.

6. Megbeszélés

A mindennapos sertéstenyésztési technológiában az FT ondó felhasználása kismértékű (Knox, 2011). A spermiumoknak a mélyfagyasztás során elszenvedett szerkezeti és funkcionális károsodása (Watson, 2000) az FS spermás termékenyítésekkel szemben alacsonyabb szaporodásbiológiai eredményeket ad (Almlid & Hofmo, 1996, Roca et al., 2006b). Módosított mélyfagyasztási protokollokat, különböző hígítókat, csomagolási formákat, mesterséges termékenyítési technológiákat – spermiumok száma/termékenyítési adag, termékenyítő adagok száma/ivarzás, termékenyítés ideje a ciklus során, a termékenyítő katéter típusa (UI, DUI), hormonális szinkronizáció és ovuláció indukció – lehet alkalmazni annak érdekében, hogy az FS termékenyítés eredményeit megközelítsék és/vagy elérjék (Großfeld et al., 2008).

Napjainkban a megfelelő minőségű mélyfagyasztott ondó előállításához modern eszközökkel felszerelt andrológiai laboratóriumokra és magas szintű szakmai ismeretekre; a felhasználásához kellő mértékű elfogadásra és tapasztalatra – különösen telepi viszonyok között – van szükség (Knox, 2011, Didion et al., 2013). A legszélesebb körben alkalmazott “standard” mélyfagyasztási technológiában a rövidebb (2-4 óra) vagy hosszabb (12-15 óra) ideig tartó ondókezelés (hígítások, centrifugálás) hőmérséklete 15-17°C. Ezt követi a 4-5°C-ra való hűtés, ahol az ondót a krioprotektánsokat tartalmazó mélyfagyasztós hígítóval tovább hígítják, equilibrálják (1,5-2,5 óra), majd szalmába töltik és mélyfagyasztják (Eriksson et al., 2002; Roca et al., 2003; Bolarin et al., 2006; Casas et al., 2010; Didion et al., 2013). Andrológiai laboratóriumunk nem rendelkezett hűthető centrifugával és programozható mélyfagyasztó berendezéssel, ezért az ondókezelés és mélyfagyasztás lépéseit HP kezeléssel megváltoztattuk. A HP-vel kapcsolatos korábbi in vitro tapasztalatok alapján (Pribenszky et al. 2004, 2005a, 2005b) feltételeztük, hogy a HP kezeléssel optimalizálni lehet a mélyfagyasztást úgy, hogy a megfelelő szubletális stresszkezelés a spermiumok mélyfagyasztással szembeni ellenállóképességét fokozza és sikeres felhasználást eredményezzen. A változtatás nem eredményezhette a spermiumok számára káros hőmérséklet ingadozás kialakulását, ezért a mélyfagyasztást megelőző valamennyi lépést (centrifugálás, hígítások, HP kezelés, hígítás mélyfagyasztott hígítóval, műszalmába töltés) az aktuális szobahőmérsékleten (20-27 °C) végeztük, majd ezt követte a további hűtés (15°C-ra 1 óra és 5°C-ra 2 óra) és a mélyfagyasztás. Habár az első in vitro kísérletünkben a spermakezelés során mért első motilitási eredményekből (HP nyomást, az 5 °C-os inkubációt követően) még nem lehetett meghatározni a legjobb hatással bíró kezelési formát (nyomás:idő), mivel csak a nyomás nagysága volt szignifikáns hatással – a nyomás időtartama nem – a TM% és PM%-ra. Mindezek ellenére egyértelmű információt nyertünk arról, hogy a 80 MPa – függetlenül a nyomás idejétől – rontó hatással van a spermiumok mozgására (TM% és PM%). Amíg a ATM (kontroll) mintákban szignifikáns csökkenés jelentkezett a 5 °C-os hűtés után a TM%-ban a hűtés előtti időszakhoz képest, addig ezt a csökkenést a 20 és 40 MPa kezelés képes volt kivédeni. A felolvasztás utáni TM% és PM%-ra – az előbbi kettő mérési pont eredményeivel szemben – a nyomás nagysága mellett már a nyomás időtartama is hatással volt. Habár a legnagyobb motilitási TM% értékeket a 40MPa:120 perc kezeléssel értük el, de a legnagyobb mértékű javító hatás a 40MPa:80 perc kezeléssel adódott. Hasonló eredményt kaptunk a PM% esetében is, de a 40MPa:80 perc kezelés javításának mértéke szignifikánsan nem különbözött a 40MPa:120 perc kombinációtól. Eredményeinkből megállapíthattuk, hogy az ondókezelés során a spermiumok dinamikus rendszerként “viselkednek” a rájuk ható HP kezeléssel szemben és bizonyítottuk, hogy a

tapasztalati úton felállított nyomás/idő mátrix kísérleti kombinációkból (20/40/80MPa: 40/80/120perc) a legjobb javító hatás a 40MPa:80 perc HP kezeléssel érhető el, aminek az alkalmazása további vizsgálatokat igényel (Pribenszky et al., 2006)

További in vitro kísérletünkben azt vizsgáltuk, hogy 40MPa:80 perc kezeléssel tovább lehet-e optimalizálni a HP alkalmazását a mélyfagyaszti protokollban. Az öt különböző lépésben tesztelt HP kezelések közül az RT-n elvégzett HP2-vel (Ext.I. hígítás után) és a HP3-mal (Ext.II. hígítás után) lehetett elérni a legnagyobb a TM%-ot és szignifikáns növekedését az ATM (kontroll) csoporthoz képest, de a többi HP kezelési módok és az ATM (kontroll) minták között az in vitro paraméterek (TM%, PM%, akroszóma-, fej- és farokmembrán) egyikében sem volt megfigyelhető szignifikáns különbség. A HP3 kezelés más szempontból is előnyösebbnek bizonyult a HP2 kezeléshez képest. Egyrészt a legnagyobb javító hatással rendelkezett az egyéb HP kezelésekkel szemben, másrészt az Ext.II. hígítás utáni kisebb térfogat (10-15 ml) jelentősen megkönnyítette az ondóminták HP kezelését. Igazoltuk, hogy a HP kezelések alkalmazásának a helye további hatással van a mélyfagyasztás utáni TM%-ra és az Ext.II. után az RT-n elvégzett 40MPa:80 perc kezeléssel további javító hatás érhető el (Horvath et al., 2011.).

Az in vivo kísérleteink során az AI-re olyan ejakulátumokat (C-FT és HP-FT) mintáit alkalmaztuk, ahol a HP-FT mintákban a TM% >40 volt. A választott határérték összhangban volt a FT sertés ondót felhasználó telepi kísérletekkel. Eriksson et al. (2002) által felhasznált ondó TM%-a 49-53% között változott, amíg Roca et al. (2003) és Bolarin et al. (2006) csak >45%, Buranaamnuay et al. (2010) >30% és Didion et al. (2013) >50% TM-mel rendelkező AI adagokat használt fel. Eriksson et al. (2002) és Didion et al. (2013) a megválasztott határértékekkel az ejakulátumok mélyfagyasztásának 95-98%-os sikerességéről számoltak be. Ez a sikerességi arány az in vivo kísérletünkben a HP-FT mintáink esetén 85,7%-os (42/49), a C-FT mintáink esetén 53,1% (26/49) volt. A 85,7% a korábbi szerzők által beszámolt eredményhez képest kis mértékben alacsonyabb, azonban a HP kezelés – a C-FT ejakulátumokhoz képest – a mélyfagyasztás sikerességét növelte. Arra a kérdésre, hogy a HP kezelés javító hatása csak a módosított mélyfagyasztási protokollunkban érvényesül-e vagy esetlegesen egy standard mélyfagyasztási rendszerben is hasonló eredményt képes nyújtani, a jelen kísérleti elrendezésünkben nem lehetett választ adni. Ennek igazolására a HP további vizsgálatára lenne szükség a két különböző mélyfagyasztási módszert alkalmazva.

Egyes szerzők szerint a spermiumok mozgása fontos és használható indikátora lehet a spermiumok termékenyítő képességének (Waberski et al., 1990; Holt et al., 1997), azonban Rodriguez-Martinez (2003) szerint a mozgás és a szaporodásbiológiai paraméterek közötti

összefüggés az FS és az FT ondó esetében sem egyértelmű és sok esetben ellentmondásos. Eriksson et al. (2002) termékenyítési kísérleti során sem találtak szignifikáns kapcsolatot a kiolvasztás utáni TM% és a szaporodásbiológiai paraméterek között. Hasonló megfigyelésre jutottak Broekhuijse et al. (2012a) is. Tapasztalataik szerint a mozgás az egyik legfontosabb és leggyakorlatiasabb érték ahhoz, hogy döntsünk egy ejakulátum további felhasználásáról, azonban a szaporodásbiológia eredményekkel való kapcsolata sok esetben nagyon gyenge. Nem találtak kapcsolatot az FS ondó sejtmembránjainak (fej, fark és akroszóma) állapota és a szaporodásbiológia eredmények között, azonban a DNS sérülésének mértéke és a fialási arány, valamint az összes malac/alom közötti kapcsolat vizsgálata szignifikáns különbséget eredményezett (Broekhuijse et al., 2012b). Hasonló megfigyelés látott napvilágot a FT ondóval kapcsolatban, ahol a glutationnak a spermiumokra kifejtett védő hatása jelentősebb mértékben érvényesült a DNS-re kifejtett védő hatásban, mint a spermiumok bármely sejtfunkciójában (Estrada et al., 2014). Részben hasonló megfigyelésre jutottak Casas et al. (2010), akik az ún. "jól és rosszul mélyfagyasztható" ejakulátumok termékenyítő képessége között véltek különbséget felfedezni. Az ún. "jól fagyasztható ejakulátumok" hímivarsejtjeinek szignifikánsan nagyobb élő/holt aránya és PM%-a kb. két és félszeresére növelte a vemhesülések valószínűségét, azonban a malacok almonkénti számára már nem volt hatással. A mozgás nagysága és a szaporodásbiológiai paraméterek közötti eltérő megfigyelések arra engednek következtetni, hogy a mozgás nagyságán túl más paramétereknek is hasonló vagy fontosabb szerepe lehet a jövőben az ejakulátumok ill. kanok termékenyítő képességének az előrejezésében.

In vivo kísérletünk során a kiolvasztás utáni TM% és PM% is szignifikánsan nagyobb volt a HP-FT csoportban, mint a C-FT csoportban. A vissza nem ivarzó aránya, a vemhesülési arány és az összes malacsám/alom szignifikánsan nagyobb volt a HP-FT, mint a C-FT csoportban, miközben egyik kísérleti csoportban sem volt szignifikáns különbség a vemhesült és a nem vemhesült kocák termékenyítésére felhasznált termékenyítő adagjainak TM% és PM%-ban. További nagyon gyenge korreláció mutatkozott a TM%, PM% értéke és az összes malac/alom között is. A HP kezelés növelte a mozgást és javította a szaporodásbiológiai mutatókat, de e két javított érték között nem lehetett közvetlen összefüggést találni. Az egyes vizsgálati időpontokban (fialáskor, választáskor és a választást követő két hét múlva) a testtömegben és a malacok számában mért nem szignifikáns különbség azt mutatja, hogy a HP kezelésnek nem volt negatív hatása sem a malacok túlélésére, sem a testtömeg gyarapodásra. Az in vitro és in vivo kísérleteink során kapott eredmények arra engednek következtetni, hogy a HP kezelés – a mozgásra kifejtett javító hatásán túl – hatással lehet a spermiumok más életfunkcióira is, ami a

javuló szaporodásbiológiai eredményeket eredményezi. Korábbi tanulmányok kimutatták, hogy a sertés spermiumokban található HSP70 és HSP90 mennyisége csökken a hűtés során, ami a szoros összefüggésben van a kiolvasztást követő alacsonyabb motilitási eredményekkel (Huang et al., 1999, Huang et al., 2000a; Huang et al., 2000b). A HP nyomás által indukált HSP növekedést figyeltek meg baktériumokban (Welch et al., 1993; Wemekamp-Kamphuis et al., 2002), a HELA sejtekben (Wang et al., 2005) és a kondrocitákban transzkripció indukálása nélkül (Kaarniranta et al., 1998). Habár a HP-val kezelt FT ondóban a HSP szintje nem különbözött a kontroll csoporthoz képest, de a vizsgált 125 fehérjefrakció közül a megtermékenyítésben fontos szerepet betöltő 7-nek (pl. perilipin) szignifikánsan magasabb volt szintje (Huang et al., 2009). Ezek a megfigyelések szoros összhangban vannak a fenti és a HP kezeléssel kapcsolatos korábbi tapasztalatokkal – a szubletális stresszel kezelt sejtek mélyfagyasztása során megfigyelt magasabb túlélése –, de a HP szerepének pontos alátámasztása további vizsgálatra szorul (Pribenszky & Vajta, 2010; Pribenszky et al., 2011).

Eriksson et al. (2002) az FT sertés ondó és a megemelkedett korai embrionális mortalitás között kapcsolatot találtak, ami élettani ciklushosszúságtól eltérő és rendszertelen ivarzás formájában jelentkezett. Ez származhatott a sikeres megtermékenyülések ellenére a vemhesség fenntartásához szükséges embriók elégtelen számából vagy a korai embrionális mortalitásból (Salamon & Visser 1973; Osinowa & Salamon 1976). Kísérletünkben a nem vemhesült kocák – két koca kivételével mindegyik kísérleti csoportban (C-FT és HP-FT) – visszaivarzásának az ideje (C-FT: $24 \pm 3,4$ nap, HP-FT: $24 \pm 2,0$ nap) szignifikáns nem különbözött ($P > 0,05$), azaz a HP kezelés ebből a szempontból nem volt hatással a nem vemhesült kocák várható visszaivarzásának az idejére.

Az FT ondóval végzett telepi kísérletek többségében elfogadható szaporodásbiológiai eredményeket programozott fagyasztóberendezésekkel (Eriksson et al., 2002; Roca et al., 2003; Bolarin et al., 2006; Bathgate et al., 2008; Casas et al., 2010; Didion et al., 2013), ovuláció szinkronizációval (Roca et al., 2003) DIU-val (Roca et al., 2003, Bolarin et al., 2006, Bathgate et al., 2008, Buranaamnuay et al., 2010.) vagy ezek együttes alkalmazásával (Roca et al., 2003, Buranaamnuay et al., 2010) érték el. Mindannak ellenére, hogy eltértünk a standard mélyfagyasztási protokolltól és cervikális termékenyítést alkalmaztunk ovuláció indukció nélkül; a HP-FT csoportban elért 78,4%-os fialási arány és a 10,8 összes malac/alom a korábbi tanulmányokhoz hasonló és tenyésztési szempontból is elfogadható eredményeket adott (fialási arány: 51-78%, összes malac/alom: 8,0-12,5).

Az AI során az egy termékenyítő adagban felhasznált sejtszám a valamikori legmagasabb volt (6×10^9 sp./term. adag). Mivel nem rendelkezünk korábbi, mélyfagyasztott sertés ondót

alkalmazó gyakorlati tapasztalatokkal, ezért Roca et al. (2003) irányszámait követtük (cervicalis termékenyítés 100 ml term. adaggal és 6×10^9 sp./term. adag). Habár az AI-k során esetlegesen előforduló visszafolyásból (Rath, 2002) és a mélyfagyasztás károsító hatásából (Watson, 2000) származó sikertelenséget kivédtük – az FS ondót alkalmazó termékenyítésekhez képest kb. kétszer ill. háromszor nagyobb sejtszámmal –, azonban a sejtszám további csökkentése szükséges ahhoz, hogy a technológia változatlan szaporodásbiológiai eredmények mellett gazdaságosabb legyen és tovább lehessen csökkenteni a méh spermiumokkal szembeni immunreakciójának mértékét (Schuberth et al., 2008).

Több évre visszatekintő FT ondót felhasználó AI-k rámutattak, hogy nem csak a technológiai lépések változtatásával lehet elfogadható eredményt elérni, hanem a számokban csak nehezen kifejezhető emberi tényezőkkel is. Négy év alatt a szaporodásbiológiai eredményekben jelentős javulást értek el mindannak ellenére, hogy az AI technológia nem változott. Ez a kellő elfogadottságának, az emberek több éves ún. „tanulási folyamatának” és a pontosabb munkának volt tulajdonítható. Ezért a mélyfagyasztott ondó alkalmazása csak olyan körülmények között ajánlható, ahol telepi menedzsment kellő mértékben felkészült és a felhasználáshoz szükséges többlet figyelem és pontosság biztosítható. Továbbá óva inteni kell az FT ondó alkalmazásától azokat a telepeket, amelyek egy hibás szaporodásbiológiai menedzsment javulását az első látásra egyszerűbbnek tűnő mélyfagyasztott ondó alkalmazásával próbálnák javítani (Didion et al., 2013).

Tapasztalataink szerint a FT sertésondó alkalmazása további tenyésztésszervezési problémákat vet fel. A nagyon alacsony alomszám több szempontból előnytelen egy telep számára. A kis számú almot (1-5 malac) gazdaságossági és munkaszervezési szempontból dajkásítani kell, viszont a koca korai involúciója még nem teszi lehetővé az újbóli termékenyítést és hiányzik a választás, mint a koca egyik legtermészetesebb ivarzásindukciója. Az ilyen kocák az elmaradt bűgások miatt könnyen selejtezésre kerülhetnek, ha bűgnak és vemhesülnek, akkor nehezen illeszthetők egy-egy választási csoportba. A különböző termelő rendszerekben az eltérő technológiákkal elért szaporodásbiológiai mutatók összehasonlítására lehetőség van, azonban az ebből levonható végső következtetéseket bizonyos óvatossággal kell kezelni. Egy technológia – még változatlan formában is – a különböző menedzsmentnek köszönhetően más szaporodásbiológiai mutatókat eredményezhet. Előnyösebb, ha az FT ondóval elért eredményeket a telep FS ondóval elért eredményeivel vagy az adott fajtakörtől általában elvárható termelési mutatóikkal hasonlítjuk össze. Az FT ondó esetében – még az alacsonyabb termelési mutatók ellenére is – nem kell számolni az apaállat bekerülési költségével, a mindennapi tartási költségekkel, az ondóvétel és kezelés feltételeivel. További előnyt jelent,

hogy a AI anyag azonnal rendelkezésünkre áll és nem kell az FS ondó minőséget befolyásoló egyéb problémáktól tartani (betegségek, sántaság, kor stb.). Valamennyi előnyt és hátrányt figyelembe véve az FT sertés ondó alkalmazása a végtermék előállításban nem, de a tenyészállat előállításban gazdaságos lehet; különösen az alacsony kocalétszámú telepeken, ahol a nagyszülők és/vagy dédszülők tartása a kisszámú termékenyítés ellenére nem nélkülözhető.

Összefoglalva: Az FT ondó gyakorlati felhasználásával kapcsolatban napjainkban már számos tapasztalat és ígéretes eredmény született. Ezt az ismeretanyagot tovább bővítettük a innovációnk során szerzett tapasztalatainkkal, amikor a mélyfagyasztást megelőző HP-val kiváltott szubletális stresszkezeléssel, módosított mélyfagyasztási protokollal és cervikális mesterséges termékenyítéssel javított szaporodásbiológiai eredményeket értünk el. További in vitro vizsgálatok szükségesek ahhoz, hogy jobban megértsük a HP kezelésnek a spermiumokra kifejtett hatását, amely új lehetőségeket nyithat az eredményesebb és gazdaságosabb felhasználáshoz és a technológia fejlődéséhez.

7. Új tudományos eredmények

Elsőként vizsgáltuk a HP kezelésekkel (nyomás/idő/hőmérséklet) kiváltott szubletális stressznek a javító hatását a spermiumok in vitro eredményeire és optimalizáltuk az alkalmazását a sertésondó mélyfagyasztási protokolljában.

Új, módosított mélyfagyasztási protokollt dolgoztunk ki, amellyel a standard mélyfagyasztási protokollokhoz hasonló sikeresség érhető el úgy, hogy a sperma kezelése, a krioprotektáns hozzáadása is – ellentétben a „standard” mélyfagyasztási protokollokkal – szobahőmérsékleten történt.

Elsőként végeztünk nagyobb számú telepi mesterséges termékenyítéseket a HP kezelt mélyfagyasztott ondóval és bizonyítottuk, hogy a HP kezeléssel mélyfagyasztott ondóval, cervikális termékenyítéssel és hormonális ivarzásszinkronizáció nélkül is javulás érhető el a kocák szaporodásbiológiai paramétereiben (vemhesülés%, fialási%, összes malac/alom, összes élő malac/alom)

Továbbá az elért szaporodásbiológiai eredmények alapján bizonyítottuk, hogy a mélyfagyasztott sertésondót felhasználó sertéstenyésztés számára egy új és eredményes aszisztált szaporodásbiológiai technológiát dolgoztunk ki.

8. Felhasznált irodalom

- Aitken R.J. and Baker M.A.: Oxidative stress and male reproductive biology. *Reprod. Fertil. Dev.*, 16. 581–588, 2004.
- Almlid T. and Hofmo P.O.: A brief review of frozen semen application under Norwegian AI service conditions. *Reprod. Dom. Anim.*, 31. 169–173, 1996.
- Bathgate R., Eriksson B.M., Thomson P.C., Maxwell W.M., Evans G.: Field fertility of frozen-thawed boar sperm at low doses using non-surgical, deep uterine insemination. *Anim. Reprod. Sci.*, 103. 323-335, 2008.
- Baumber J., Ball B.A., Linfor J.J., Meyers S.A.: Reactive oxygen species and cryopreservation promote DNA fragmentation in equine spermatozoa. *J. Androl.*, 24. 621–628, 2003.
- Bilodeau J.F., Blanchette S., Gagnon C., Sirard M.A.: Thiols prevent H₂O₂ mediated loss of sperm motility in cryopreserved bull semen. *Theriogenology*, 56. 275–286, 2001.
- Bilodeau, J.F., Chateerjee S., Sirard M.A., Gagnon C.: Levels of antioxidant defenses are decreased in bovine spermatozoa after a cycle of freezing and thawing. *Mol. Reprod. Dev.*, 55. 282-288, 2000.
- Bolarin A., Roca J., Rodriguez-Martinez H., Hernandez M., Vazquez J.M., Martinez E.A.: Dissimilarities in sows' ovarian status at the insemination time could explain differences in fertility between farms when frozen-thawed semen is used. *Theriogenology*, 65. 669-680, 2006.
- Brezezińska-Slebodzińska E., Slebodziński A.B., Pietras B., Wieczorek G.: Antioxidant effect of Vitamin E and Glutathione on lipid peroxidation in boar semen plasma. *Biol. Trace Elem. Res.*, 47. 69–74, 1995.
- Broekhuijse M.L., Sostaric E., Feitsma H., Gadella, B.M.: The value of microscopic semen motility assessment at collection for a commercial artificial insemination center, a retrospective study on factors explaining variation in pig fertility. *Theriogenology*, 77. 1466-1479, 2012a.
- Broekhuijse M.L., Sostaric, E., Feitsma, H., Gadella, B.M.: Relationship of flow cytometric sperm integrity assessments with boar fertility performance under optimized field conditions. *J. Anim. Sci.*, 90. 4327-4336, 2012b.
- Brouwers J.F., Silva P.F.N., Gadella B.M.: New assays for detection and localization of endogenous lipid peroxidation products in living boar sperm after BTS dilution or after freeze–thawing. *Theriogenology*, 63. 458–469, 2005.

- Brüssow K.P., Torner H., Rátky J.: Sperm migration in pigs after deep intrauterine and intraperitoneal insemination. *J. Reprod. Dev.*, 57. 342-345, 2011.
- Buranaamnuay K., Padet T., Mongkol T.: Intra-uterine insemination with low numbers of frozen-thawed boar spermatozoa in spontaneous and induced ovulating sows under field conditions *Livest. Sci.*, 131. 115–118, 2010.
- Bwanga C.O., de Braganca M.M., Einarsson S., Rodriguez-Martinez H.: Cryopreservation of boar semen in mini- and maxi straws. *J. Vet. Med. Assoc.*, 37. 651-658, 1990.
- Caballero I., Vazquez J.M., Gil M.A., Calvete J.J., Roca J., Sanz L., Parrilla I., Garcia E.M., Rodriguez-Martinez H., Martinez E.A.: Does seminal plasma PSP-I/PSP-II spermadhesin modulate the ability of boar spermatozoa to penetrate homologous oocytes in vitro? *J. Androl.*, 25. 1004–1015, 2004.
- Carvajal G., Cuello C., Ruiz M., Vazquez J.M., Martinez E. A., Roca, J.: Effects of centrifugation before freezing on boar sperm cryosurvival. *J. Androl.*, 25. 389–396, 2004.
- Casas I., Sancho S., Briz M., Pinart E., Bussalleu E., Yeste M., Bonet S.: Fertility after post-cervical artificial insemination with cryopreserved sperm from boar ejaculates of good and poor freezability. *Anim. Reprod. Sci.*, 118. 69–76, 2010.
- Centurion F., Vazquez J.M., Calvete J.J., Roca J., Sanz L., Parrilla I., Garcia E.M., Martinez E.A.: Influence of porcine spermadhesins on the susceptibility of boar spermatozoa to high dilution. *Biol. Reprod.*, 69. 640–646, 2003.
- Cerolini S., Maldjian A., Surai P., Noble R.: Viability, susceptibility to peroxidation and fatty acid composition of boar semen during liquid storage. *Anim. Reprod. Sci.*, 58. 99-111, 2000.
- Conconi M., Szweda L.I., Levine R.L., Stadtman E.R., Friguet B.: Age-related decline of rat liver multicatalytic proteinase activity and protection from oxidative inactivation by heat-shock protein 90. *Arch. Biochem. Biophys.* 331. 232–240, 1996.
- Cordova A., Perez-Gutierrez J.F., Lleo B., Garcia-Artiga C., Alvarez A., Drobchak V.: In vitro fertilizing capacity and chromatin condensation of deep frozen boar semen packaged in 0.5 and 5 mL straws. *Theriogenology*, 57. 2119–2128, 2002.
- Cummins J. M., Jequier A. M., Kan R.: Molecular biology of the human male infertility: links with aging, mitochondrial genetics and oxidative stress. *Mol. Reprod. Dev.*, 37. 345–362, 1994.
- Daw A., Farrant J., Morris G.J.: Membrane leakage of solutes after thermal shock or freezing. *Cryobiology*, 10. 126–133, 1973.
- Demazeau G. and Rivalain N.: High hydrostatic pressure and biology: a brief history. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 89. 1305–1314, 2011.

- Didion B.A., Braun G.D., Duggan M.V.: Field fertility of frozen boar semen: A retrospective report comprising over 2600 AI services spanning a four year period. *Anim. Reprod. Sci.*, 137. 189–196, 2013.
- Du Y., Pribenszky C.S., Molnár M., Zhang X., Yang H., Kuwayama M., Pedersen A.M., Villemoes K., Bolund L., Vajta, G.: High hydrostatic pressure: a new way to improve in vitro developmental competence of porcine matured oocytes after vitrification. *Reproduction*, 135. 13-17, 2008.
- Eriksson B.M., Petersson H., Rodriguez-Martinez H.: Field fertility with exported boar semen frozen in the new FlatPack container. *Theriogenology*, 58. 1065-1079, 2002.
- Estrada E., Rodríguez-Gil J.E., Rocha L.G., Balasch, S., Bonet, S., Yeste, M.: Supplementing cryopreservation media with reduced glutathione increases fertility and prolificacy of sows inseminated with frozen-thawed boar semen. *Andrology*, 2. 88-99, 2014.
- Fazeli A., Duncan A.E., Watson P.F., Holt W.V.: Sperm-oviduct interaction: induction of capacitation and preferential binding of uncapacitated spermatozoa to oviductal epithelial cells in porcine species. *Biol. Reprod.*, 60. 879–886, 1999.
- Flores E., Cifuentes D., Fernández-Novell J.M., Medrano A., Bonet S., Briz M.D., Pinart E., Peña A., Rigau T., Rodríguez-Gil J.E.: Freeze-thawing induces alterations in the protamine-1/DNA overall structure in boar sperm. *Theriogenology*, 69. 1083–1094, 2008.
- Fraser L. and Strzezek J.: Effects of freezing–thawing on DNA integrity of boar spermatozoa assessed by the Neutral Comet Assay. *Reprod. Domest. Anim.*, 40. 530–536, 2005.
- Gaczarzewicz D., Piasecka M., Udala J., Blaszczyk B., Laszczynska M., Kram A.: Oxidoreductive capability of boar sperm mitochondria in fresh semen and during their preservation in BTS extender. *Reprod. Biol.*, 3. 161–172, 2003.
- Gerrits R.J., Lunney J.K., Johnson L.A., Pursel V.G., Kraeling R.R., Rohrer G.A., Dobrinsky J.R.: Perspectives for artificial insemination and genomics to improve global swine populations. *Theriogenology*, 63. 283–299, 2005.
- Gil J., Tortades J.M., Alevia A.: Post-cervical insemination use of small volumes and spermnumber. In: *Proceedings of the XVIIIth International Pig Veterinary Society Congress*, Ames, USA, 456, 2004.
- Gil M.A., Roca J., Cremades T., Hernández M., Vázquez J.M., Rodríguez-Martínez H., Martínez E.A.: Does multivariate analysis of post thaw spermcharacteristics accurately estimate in vitro fertility of boar individual ejaculates? *Theriogenology*, 64. 305–316, 2005.

- Griffiths J.B., Cox C.S., Beadle D.J., Hunt C.J., Reid D.S.: Changes in cell size during the cooling, warming and post-thawing periods of the freeze–thaw cycle. *Cryobiology*, 16. 141–151, 1979.
- Großfeld R., Sieg B., Struckmann C., Frenzel A., Maxwell W.M.C., Rath, D.: New aspects of boar semen freezing strategies. *Theriogenology*, 70. 1225–1233, 2008.
- Hamamah S., Royere D., Nicolle J.C., Paquignon M., Lansac J.: Effect of freezing on the spermatozoa nucleus: A comparative chromatin cytophotometric study in the porcine and human species. *Reprod. Nutr. Dev.*, 30. 59–64, 1990.
- Hernandez M. and Roca J.: Differences in SCSA outcome among boars with different sperm freezability. *J. Androl.*, 29. 583–591, 2006.
- Holt C., Holt W.V., Moore H.D.M., Reed H.C.B., Curnock R.M.: Objectively measured boar sperm motility parameters correlate with the outcomes of on-farm inseminations: results of two fertility trials. *J. Androl.*, 18. 312–323, 1997.
- Holt W.V. and Medrano A.: Assessment of boar sperm function in relation to freezing and storage. *J. Reprod. Fertil.*, 52. 213–222, 1997.
- Horvath A., Végh L., Szenci O., Pribenszky C.: Sublethal stress treatment of boar semen before cryopreservation enhances cryotolerance - solutions for treatment protocol. *Reprod. Dom. Anim.*, 46. 91–92, 2011.
- <http://en.wikipedia.org/wiki/Pork>)
- http://en.wikipedia.org/wiki/World_population
- <http://www.termesztvilaga.hu>
- Huang S.Y., Kuo Y.H., Lee W.C., Tsou H.L., Lee Y.P., Chang H.L., Wu J.J., Yang P.C.: Substantial decrease of heat-shock protein 90 precedes the decline of sperm motility during cooling of boar spermatozoa. *Theriogenology*, 51. 1007–1016, 1999.
- Huang S.Y., Kuo Y.H., Lee Y.P., Tsou H.L., Lin E.C., Ju C.C., Lee W.C.: Association of heat shock protein 70 with semen quality in boars. *Anim. Reprod. Sci.*, 63. 231–240, 2000b
- Huang S.Y., Kuo Y.H., Tsou H.L., Lee Y.P., King Y.T., Huang H.C., Yang P.C., Lee W.C.: The decline of porcine sperm motility by geldanamycin, a specific inhibitor of heat-shock protein 90 (HSP90). *Theriogenology*, 53. 1177–1184, 2000a.
- Huang S.Y., Pribenszky C., Kuo Y.H., Teng S.H., Chen Y.H., Chung M.T., Chiu Y.F.: Hydrostatic pressure pre-treatment affects the protein profile of boar sperm before and after freezing–thawing. *Anim. Reprod. Sci.*, 112. 136–149, 2009.

- Jiang Z.L., Li Q.W., Li W.Y., Hu J.H., Zhao H.W., Zhang S.S.: Effect of low density lipoprotein on DNA integrity of freezing-thawing boar sperm by neutral comet assay. *Anim. Reprod. Sci.*, 99. 401–407, 2007.
- Johnson L. A.: Fertility results using frozen boar spermatozoa: 1970–1985. In: Johnson L.A. and Larsson K. (eds): *Deep Freezing of Boar Semen*. Swedish University of Agricultural Science. Uppsala, 199–222, 1985.
- Johnson L.A., Aalbers J.G., Willems C.M., Sybesma W.: Use of boar spermatozoa for artificial insemination. I. Fertilizing capacity of fresh and frozen spermatozoa in sows on 36 farms. *J. Anim. Sci.*, 52. 1130–1136, 1981.
- Johnson L.A., Weitze K.F., Fiser P., Maxwell W.M.C.: Storage of boar semen. *Anim. Reprod. Sci.*, 62. 143–172, 2000.
- Kaarniranta K., Elo M., Sironen R., Lammi M.J., Goldring M.B., Eriksson J.E., Sistonen L., Helminen H.J.: Hsp70 accumulation in chondrocytic cells exposed to high continuous hydrostatic pressure coincides with mRNA stabilization rather than transcriptional activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 95. 2319–2324, 1998.
- Kaneto M., Harayama H., Miyake M., Kato S.: Capacitation-like alterations in cooled boar spermatozoa: assessment by the chlortetracycline staining assay and immunodetection of tyrosine-phosphorylated sperm proteins. *Anim. Reprod. Sci.*, 73. 197–209, 2002.
- Kirkwood R.N., Vadnais M.L., Abad M.: Practical application of seminal plasma. *Theriogenology*, 70. 1364–1367, 2008.
- Knox R.V.: The current value of frozen-thawed boar semen for commercial companies. *Reprod. Domest. Anim.*, 46. 4-6, 2011.
- Kovacs A. and Foote R.H.: Viability and acrosome staining of bull, boar and rabbit spermatozoa. *Biot. Histoc.*, 67. 119-124, 1992.
- Kültz D.: DNA damage signals facilitate osmotic stress adaptation. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.*, 289. 504–505, 2005.
- Kültz D.: Evolution of the cellular stress proteome: from mono- phyletic origin to ubiquitous function. *J. Exp. Biol.*, 206. 3119–3124, 2003.
- Leahy T. and Gadella B. M.: Sperm surface changes and physiological consequences induced by sperm handling and storage. *Reproduction*, 142. 759–778, 2011.
- Lewis S.E., Donnelly E.T., Sterling E.S., Kennedy M.S., Thompson W., Chakravarthy U.: Nitric oxide synthase and nitrite production in human spermatozoa: evidence that endogenous nitric oxide is beneficial to sperm motility. *Mol. Hum. Reprod.* 2. 873–878, 1996.

- Maldjiana A., Pizzi F., Gliozzi T., Cerolini S., Penny P., Noble R.: Changes in sperm quality and lipid composition during cryopreservation of boar semen. *Theriogenology*, 63. 411–421, 2005.
- Mann T. and Lutwak-Mann C.: *Male Reproductive Function and Semen*. 495. 1981. Springer-Verlag. Heidelberg.
- Martinez E.A., Vazquez J.M., Roca J., Lucas X., Gil M.A., Parrilla I., Vazquez J.L., Day B.N.: Minimum number of spermatozoa required for normal fertility after deep intrauterine insemination in non-sedated sows. *Reproduction*, 1. 163–170, 2002.
- Maxwell W. M. and Johnson L.A.: Physiology of spermatozoa at high dilution rates: the influence of seminal plasma. *Theriogenology*, 52. 1353–1362, 1999.
- Mazur P., Leibo S.P., Chu E.H.Y.: A two-factor hypothesis of freezing injury. *Exp. Cell. Res.*, 71. 345–355, 1972.
- Mazur P.: Kinetics of water loss from cells at subzero temperatures and the likelihood of intracellular freezing. *J. Gen. Physiol.*, 47. 347–369, 1963.
- Mazur P.: The role of intracellular freezing in the death of cells cooled at supraoptimal rates. *Cryobiology*, 14. 251–272, 1977.
- Muldrew K., McGann L.E.: Mechanisms of intracellular ice formation. *Biophys. J.*, 57. 525–532, 1990.
- Okazaki T., Abe S., Yoshida S., Shimada M.: Seminal plasma damages sperm during cryopreservation, but its presence during thawing improves semen quality and conception rates in boars with poor post-thaw semen quality. *Theriogenology*, 71. 491–498, 2009.
- Osinowa O., and Salamon S.: Fertility of boar semen. *Aust. J. Biol. Sci.*, 29. 335-339, 1976.
- Parks J. E., Graham J. K.: Effects of cryopreservation procedures on sperm membranes. *Theriogenology*, 38. 209–222, 1992.
- Parks J.E., Lynch D.V.: Lipid composition and thermotropic phase behavior of boar, bull, stallion and rooster sperm membranes. *Cryobiology*, 29. 255–266, 1992.
- Pena F.J., Saravia F., Nunez-Martinez I., Johannisson A., Wallgren M., Rodriguez-Martinez H.: Do different portions of the boar ejaculate vary in their ability to sustain cryopreservation? *Anim. Reprod. Sci.*, 93. 101-113, 2006.
- Penny P.C., Noble R.C., Maldjian A., Cerolini S.: Potential role of lipids for the enhancement of boar fertility and fecundity. *Pig News Inform*, 25. 119–126, 2000.
- Petrunkina A.M., Volker G., Weitze K.F., Beyerbach M., Töpfer-Petersen E., Waberski D.: Detection of cooling-induced membrane changes in the response of boar sperm to capacitating conditions. *Theriogenology*, 63. 2278–2299, 2005.

- Polge C., Salamon S., Wilmut I.: Fertilizing capacity of frozen boar semen following surgical insemination. *Vet. Rec.*, 87. 424–429, 1970.
- Polge C., Smith A.U., Parks A. S.: Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. *Nature*, 164. 666–678, 1949.
- Pribenszky C., and Vajta G.: Cells under pressure: how sublethal hydrostatic pressure stress treatment increases gametes' and embryos' performance? *Reprod. Fertil. Dev.*, **23**. 48-55, 2010.
- Pribenszky C., Du Y., Molnár M., Harnos A., Vajta, G.: Increased stress tolerance of matured pig oocyte by high hydrostatic pressure treatment. *Anim. Reprod. Sci.*, 106. 200–207, 2008.
- Pribenszky C., Horváth A., Végh L., Huang S.Y., Kuo Y.H., Szenci, O.: Stress Preconditioning of Boar Spermatozoa: A New Approach to Enhance Semen Quality. *Reprod. Domest. Anim.*, 46. 26-30, 2011.
- Pribenszky C., Molnár M., Cseh S., Solti, L.: Improving post-thaw survival of cryopreserved mouse blastocysts by hydrostatic pressure challenge. *Anim. Reprod. Sci.*, 87. 143-150, 2005a.
- Pribenszky C., Molnar M., Cseh S., Solti, L.: Survival of mouse blastocysts after low-temperature preservation under high pressure. *Acta Vet. Hung.*, 52. 479–487, 2004.
- Pribenszky C., Molnár M., Horváth A., Harnos A., Szenci, O.: Hydrostatic pressure induced increase in post-thaw motility of frozen boar spermatozoa. *Reprod. Fertil. Dev.*, 18. 162–163, 2006.
- Pribenszky C., Molnar M., Horvath A., Kutvolgyi G., Harnos A., Szenci O., Dengg J., Lederer J.: Improved post-thaw motility, viability and fertility are achieved by hydrostatic pressure treated bull semen. *Reprod. Fertil. Dev.*, 19. 181–182, 2007.
- Pribenszky C., Molnár M., Ulrich P., Barbosa C.C., Hatamoto L.K., Santo C.E.P. Pressure assisted cryopreservation: a novel possibility for IVP bovine blastocyst cryopreservation. *Reprod. Dom. Anim.*, 40. 338, 2005b.
- Pribenszky C., Vajta G., Molnar M., Du Y., Lin L., Bolund L., Yovich J.: Stress for stress tolerance? A fundamentally new approach in mammalian embryology. *Biol. Reprod.*, 83. 690-697, 2010.
- Prodromou C., Roe S.M., O'Brien R., Ladbury J.E., Piper P.W., Pearl L.H.: Identification and structural characterization of the ATP/ADP-binding site in the Hsp90 molecular chaperone. *Cell*. 90. 65–75, 1997.
- Pursel V.G., Johnson L.A., Schulman L.L.: Effect of dilution, seminal plasma and incubation period on cold shock susceptibility of boar spermatozoa. *J. Anim. Sci.*, 37. 528-531, 1973.

- Pursel V.G., Johnson L.A.: Fertility with frozen boar semen. *J. Anim. Sci.*, 33. 265, 1971.
- Pursel V.G., Johnson L.A.: Freezing of boar spermatozoa: fertilizing capacity with concentrated semen and a new thawing procedure. *J. Anim. Sci.*, 40. 99–102, 1975.
- Rath D. and Niemann H.: In vitro fertilization of porcine oocytes with fresh and frozen-thawed ejaculated or frozen-thawed epididymal semen obtained from identical boars. *Theriogenology*, 47. 785–793, 1997.
- Rath D.: Low dose insemination in the sow—a review. *Reprod. Dom. Anim.*, 37. 201–205, 2002.
- Roca J., Carvajal G., Lucas X., Vázquez J.M., Martínez E.A.: Fertility of weaned sows after deep intrauterine insemination with a reduced number of frozen-thawed spermatozoa. *Theriogenology*, 60. 77–87, 2003.
- Roca J., Gil M.A., Hernandez M., Parrilla I., Vázquez J.M., Martínez E.A.: Survival and fertility of boar spermatozoa after freeze-thawing in extender supplemented with butylated hydroxytoluene. *J. Androl.*, 25. 397–405, 2004.
- Roca J., Rodríguez-Martínez H., Vázquez J.M., Bolarín A., Hernández M., Saravia F., Wallgren M., Martínez E.A.: Strategies to improve the fertility of frozen-thawed boar semen for artificial insemination. In: 'Control of Pig Reproduction. VII. Manor Farm'. (Eds C.J. Ashworth and R.R. Kraeling) 261–275, 2006a. (Nottingham University Press, Nottingham, United Kingdom)
- Roca J., Vázquez J.M., Gil M.A., Cuello C., Parrilla I., Martínez E.A.: Challenges in pig artificial insemination. *Reprod. Domest. Anim.*, 41. 43–53, 2006b.
- Rodríguez-Martínez H. and Wallgren M.: Advances in Boar Semen Cryopreservation *Vet. Med. Int.*, 2010. doi: 10.4061/2011/396181.
- Rodríguez-Martínez H., Saravia F., Wallgren M., Tienthai P., Johannisson A., Vázquez J.M., Martínez E., Roca J., Sanz L., Calvete J.J.: Boar spermatozoa in the oviduct. *Theriogenology*, 63. 514–535, 2005.
- Rodríguez-Martínez H.: Aspects of the electrolytic composition of boar epididymal fluid with reference to sperm maturation and storage. *Reprod. Domest. Anim.*, 1. 13–27, 1991.
- Rodríguez-Martínez H.: Laboratory semen assessment and prediction of fertility: still utopia? *Reprod. Domest. Anim.*, 38. 312–318, 2003.
- Rodríguez-Martínez H.: Role of the oviduct in sperm capacitation. *Theriogenology*, 68. 138–146, 2007.
- Salamon S., and Visser D.: Fertility test of frozen boar spermatozoa. *Aust. J. Biol. Sci.*, 26. 292–293, 1973.

- Santoro M.G.: Heat shock factors and the control of the stress response. *Biochem. Pharmacol.*, 59. 55–63. 2000.
- Saravia F., Hernández M., Wallgren M., Johannisson A., Rodríguez-Martínez H.: Controlled cooling during semen cryopreservation does not induce capacitation of spermatozoa from two portions of the boar ejaculate. *Int. J. Androl.*, 30. 485–499, 2007.
- Schuberth H.J., Taylor U., Zerbe H., Waberski D., Hunter R., Rath, D.: Immunological responses to semen in the female genital tract. *Theriogenology*, 70. 1174-1181, 2008.
- Selye H.: A syndrome produced by diverse nocuous agents. *Nature*, 138. 32, 1936
- Selye H.: Confusion and controversy in the stress field. *J. Human Stress*, 1. 37–44, 1975.
- Silva P.F.N. and Gadella B.M.: Detection of damage in mammalian sperm cells. *Theriogenology*, 65. 958–978, 2006.
- Strzezek J., Kordan W., Kostyra H., Zaborniak. A.: Purification and partial characterization of a 5700 Da sperm motility inhibitor factor from seminal plasma of boar. *Anim. Reprod. Sci.*, 29. 35–42, 1992.
- Tamuli M. K., Watson P. F.: Cold resistance of live boar spermatozoa during incubation after ejaculation. *Vet. Rec.*, 135. 160–162, 1994.
- Vadnais M.L., Kirkwood R.N., Sprecher D.J., Chou K.: Effects of extender, incubation temperature, and added seminal plasma on capacitation of cryopreserved, thawed boar sperm as determined by chlortetracycline staining. *Anim. Reprod. Sci.*, 90. 347–354, 2005b.
- Vadnais M.L., Kirkwood R.N., Tempelman R.J., Sprecher D.J., Chou K.: Effect of cooling and seminal plasma on the capacitation status of fresh boar sperm as determined using chlortetracycline assay. *Anim. Reprod. Sci.*, 87. 121–132. 2005a
- Waberski D., Dirksen G., Weitze K. F., Leiding C., Hahn, R.: Field studies of the effect of sperm motility and morphology on the fertility of boars used for insemination. *Tierärztl. Prax.*, 18. 591-594, 1990.
- Waberski D., Weitze K.F., Gleumes T., Schwarz M., Willmen T., Petzoldt, R.: Effect of time of insemination relative to ovulation on fertility with liquid and frozen boar semen. *Theriogenology*, 42. 831–840, 1994.
- Wang P, Shu Z., He L., Cui X., Wang Y., Gao D.: The pertinence of expression of heat shock proteins (HSPs) to the efficacy of cryopreservation in HELAs. *Cryo Letters.*, 26. 7–16, 2005.
- Watson P.F.: The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Anim. Reprod. Sci.*, 60–61. 481–492, 2000.

- Welch T.J., Farewell A., Neidhardt F.C., Bartlett D.H.: Stress response of *Escherichia coli* to elevated hydrostatic pressure. *J. Bacteriol.*, 175. 7170–7177, 1993.
- Wemekamp-Kamphuis H.H., Karatzas A.K., Wouters J.A., Abee T.: Enhanced levels of cold-shock proteins in *Listeria monocytogenes* LO28 upon exposure to low temperature and high hydrostatic pressure. *Appl. Environ. Microbiol.*, 68. 456–463, 2002.
- Westendorf P., Richter L., Treu H.: Zur Tiefgefrierung von Ebersperma: Labor- und Besamungsergebnisse mit dem Hülsenberger Pailletten-Verfahren. *Dtsch. Tierärztl. Wschr.*, 82. 261–267, 1975.
- Woelders H., Matthijs A., Zuidberg C.A., Chaveiro A.E.: Cryopreservation of boar semen: equilibrium freezing in the cryomicroscope and in straws. *Theriogenology*, 63. 383–395, 2005.
- Woelders H.: Fundamentals and recent development in cryopreservation of bull and boar semen. *Vet. Quart.*, 19. 135–138, 1997.
- Wongtawan T., Saravia F., Wallgren M., Caballero I., Rodríguez-Martínez, H.: Fertility after deep intra-uterine artificial insemination of concentrated low-volume boar semen doses. *Theriogenology*, 65. 773-787, 2006.

9. A témában megjelent tudományos közlemények

Pribenszky C., **Horváth A.**, Végh L., Huang S.Y., Kuo Y.H. and Szenci O.: Stress Preconditioning of Boar Spermatozoa: A New Approach to Enhance Semen Quality. *Reprod. Domest. Anim.*, 46. 26-30, 2011. [IF: 1,356]

Horváth A., Pribenszky C., Szenci O.: A sertésondó mélyfagyasztása I.: A mélyfagyasztás hatása a sertés hímivarsejtjeire. Irodalmi összefoglaló. *Magyar Állatorvosok Lapja*, 136. 90-96, 2014. [IF: 0,155]

Horváth A., Pribenszky C., Szenci O.: A sertésondó mélyfagyasztása II. A mélyfagyasztott sertésondó használata telepi körülmények között. *Magyar Állatorvosok Lapja*, 136. 141-147, 2014. [IF: 0,155]

Horváth A., Szenci O., Nagy K., Végh L., Pribenszky C.: Stress preconditioning of semen before cryopreservation improves fertility and increases the number of offspring born: a prospective randomised study using a porcine model. *Reprod. Fertil. Dev.*, <http://dx.doi.org/10.1071/RD14118> [IF: 2,577]

A témában tartott előadások, poszterek nemzetközi konferenciákon

Pribenszky C., Molnar M., **Horvath A.**, Harnos A., Szenci O. (poszter): Hydrostatic pressure induced increase in post-thaw motility of frozen boar spermatozoa. 32th Annual Conference of the International Embryo Transfer Society. 7-11 Jan 2006, Orlando, Florida, USA. *Reprod. Fertil. Dev.*, 18, 162-163.

Pribenszky C., Molnar M., **Horvath A.**, Kutvolgyi G., Harnos A., Szenci O., Dengg J., Lederer J. (poszter): Improved post-thaw motility, viability, and fertility are achieved by hydrostatic pressure-treated bull semen. 33th Annual Conference of the International Embryo Transfer Society. 6-10 Jan 2007, Kyoto, Japan. *Reprod. Fertil. Dev.*, 19, 181-182.

Pribenszky C., Molnar M., Kutvolgyi G., Harnos A., **Horvath A.**, Hejja I. (poszter): Sublethal stress treatment of fresh boar semen with high hydrostatic pressure, inserted into the routine insemination procedure improves average live litter size. 12th Annual Conference of the European Society for Domestic Animal Reproduction. 20-23 Nov 2008, Utrecht, Netherlands. *Reprod. Domest. Anim.*, 43, (Suppl. 5) 47.

Kutvolgyi G., **Horvath A.**, Molnar M., Horvath G., Pribenszky C. (poszter): Effect of hydrostatic pressure pulse on the life-time of fresh extended boar semen at 15 degrees C storage and following insemination on pregnancy rate and litter characteristics. 16th International Congress on Animal Reproduction. 13-17 July 2008, Budapest, Hungary. *Reprod. Domest. Anim.*, 43, (Suppl. 3) 119.

Kutvölgyi G., **Horvath A.**, Olah I., Palinkas P., Meresz L., Molnar M., Pribenszky Cs., Szenci O. (poszter): High hydrostatic pressure treatment of fresh bull semen increases the proportion of cells surviving the freezing-thawing procedure in a Hungarian Holstein Friesian bull population. 25th World Buiatrics Congress. 6-11 July 2008, Budapest, Hungary. *Magyar Állatorvosok Lapja*, 130, (Suppl. II) 217.

Pribenszky Cs., Molnar M., Kutvölgyi G., Harnos A., **Horvath A.**, Hejja I. (poszter): Sublethal hydrostatic pressure treatment improves fresh and chilled boar semen quality in vitro and in vivo. 35th Annual Conference of the International Embryo Transfer Society, 3–7 Jan 2009, San Diego, California, USA. *Reprod. Fertil. Dev.*, 21, 107.

Kutvolgyi G., **Horvath A.**, Olah I., Palinkas P., Meresz L., Molnar M., Szenci O., Pribenszky Cs. (poszter): Sublethal stress treatment of bull semen before cryopreservation increases cells' cryotolerance. 26th World Buiatrics Congress, Santiago, Chile, 14-18. Nov. 2010. In: *Proceeding of 26th World Buiatrics Congress* 360.

Horvath A., Végh L., Szenci O., Pribenszky C. (poszter): Sublethal stress treatment of boar semen before cryopreservation enhances cryotolerance - solutions for treatment protocol (poszter). 7th International Conference on Boar Semen Preservation. 14-17 August 2011, Bonn, Germany. *Reprod. Domest. Anim.*, 46, (Suppl. 2.) 91-92.

Horvath A., Végh L., Nagy K., Zoldag L., Szenci O., Pribenszky C. (előadás): Field fertility results of sublethal stress treated frozen-thawed boar semen using commercial cervical insemination without ovulation induction. 24th Annual meeting of EU-AI-Vets. 29-30 August 2012, Dublin, Ireland. In: Proceeding of 24th Annual meeting of EU-AI-Vets. 35.

Horvath A., Vegh L., Nagy K., Zoldag L., Szenci O., Pribenszky C. (poszter): Field fertility results of sublethal stress treated frozen-thawed boar semen using commercial cervical insemination without ovulation induction. 17th International Congress on Animal Reproduction. July 29 - Aug 2 2012, Vancouver, Canada. *Reprod. Domest. Anim.*, 47, (Suppl. 4.) 447.

Kutatási eredményekkel kapcsolatos szabadalom

Pribenszky Cs., Molnár M., **Horváth A.**: Az életképes biológiai anyag – beleértve a gamétákat és embriókat is – életképességének és stressztoleranciájának növelése.

Magyar bejelentés: HU/22.11.2005./ HUA P0501079

Increasing the viability of viable biological material.

Nemzetközi bejelentés: PCT/IB2006/054358

10. Köszönetnyilvánítás

Tudományos munkám anyagi és infrastruktúrális feltételeinek maradéktalan biztosításáért, a publikációim kéziratainak a lektorálásában nyújtott segítségéért, valamint a Tanszékünkön tapasztalható kollegiális, baráti légkör megteremtéséért szeretném kifejezni a köszönetemet témavezetőmnek, Prof. Dr. Szenci Ottónak.

Köszönöm a másik témavezetőmnek Csabának (dr. Pribenszky Csaba) azt töretlen akarást, biztatást és magas szintű menedzsmenetet, valamint szakmai ismeretet, ami nélkül ezek a programok és eredmények soha nem valósulhattak volna meg.

Köszönettel tartozom dr. Harnos Andreának és dr. Nagy Krisztának a statisztikai elemzésekben nyújtott áldozatos segítségükért, továbbá Végh Lacinak a közös munkánk gördülékeny megvalósításáért.

Köszönöm Molnár Miklósnak, hogy műszaki ismereteivel és emberi hozzáállásával a kezdeti nehézségek közepette is töretlen segítséggel állt rendelkezésünkre mindenben.

További köszönet illeti a Felsőbabádi Zrt. csapatát Fekete János vezetésével és a lajoskomáromi Győzelem Mg. Szövetkezetből Reisz Istvánt, Kiss Csabát és munkatársait, hogy támogatásukkal és szakmai tapasztalataikkal lehetővé tették a kísérleti eredményeink telepi kipróbálását.

A köszöntésben jöjjenek a laboros kolléganők (Sipos Erzszi és Tani Erzszi), akik munkáink során mindvégig a rendelkezésünkre álltak.

Külön köszönet illeti Kati Mamát, aki minden esetben haladéktalanul "rendelkezésemre bocsájtotta" Jánost (John Vásárhelyi), akinek felbecsülhetetlen érdemei vannak a kéziratok, az absztraktok angol nyelvtani és nem utolsó sorban szakmai bírálatában.

Zsuzskámnak és a fiúknak pedig köszönet a szeretetükért és türelmükért.