

MTA Doktori értekezés tézisei

**Gazdasági állatok spermaminőség-ellenőrzésének
automatizálási lehetőségei**

Dr. Nagy Szabolcs Tamás

Keszthely

2019

TARTALOM

BEVEZETÉS, CÉLKITÚZÉSEK	4
EREDMÉNYEK ÉS KÖVETKEZTETÉSEK	6
TÉZISPONTOK, ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK	8
KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	11
A TÉZISEKET BIZONYÍTÓ PUBLIKÁCIÓK	12

BEVEZETÉS, CÉLKITŰZÉSEK

A sikeres termékenyítés eléréséhez egyrészt az egyes spermiumoknak kell több szempontból is megfelelőnek lenniük (membránintegritás, akroszóma-állapot, mitokondriális aktivitás, kromatinintegritás stb.), másfelől az adott ejakulátumnak vagy mélyhűtött-felolvasztott termékenyítő adagnak megfelelő arányban kell tartalmaznia ilyen ondósejteket. Az ideális *in vitro* fertilitási teszt egyidejűleg a lehető legtöbb tulajdonságot értékeli sejtszinten.

A spermiumok az alábbi doménekre oszthatók: fej, középrész és farok. Ezek további szubdoménekre bonthatók: a fejen a plazmamembrán szubdoménjei a gaméta-interakcióban játszanak szerepet (zóna-kötődés, akroszóma-reakció, zóna penetráció stb.). Az akroszóma a spermiumfej apikális részén található vezikulum, amely a zóna penetrációhoz szükséges enzimeket tartalmazza. A fej tartalmazza továbbá a spermium speciális, protamin-DNS komplexből álló kromatinját. A középrészben találhatók a mitokondriumok, amelyek az energiatermelésben játszanak szerepet. A farok szerepe a motilitás biztosítása. A spermiumok kromatin-állományának szerkezeti rendellenességei a termékenyítőképesség, illetve a hím pronukleusz-képződés zavarait okozhatják, továbbá káros hatással lehetnek az embrió fejlődésére is. Ezeket a rendellenességeket „nem kompenzálhatónak” tekintjük, mivel a szubfertilis hímek termékenyítőképessége nem javítható a termékenyítő adag sejtszámának növelésével. Azok az ondósejtek, amelyek nem kompenzálható rendellenességekkel bírnak, képesek ugyan a petesejtbe hatolni és a termékenyítésre is, de az embriófejlődés szenvedhet zavart.

Vizsgálataim fő célja a mesterséges termékenyítésre használt sperma domén-specifikus minőségellenőrzésének automatizálása volt flow citometria – áramlási sejtanalízis – alkalmazásával. A flow citometria rövid idő alatt nagyszámú sejt (> 10 000 sejt mintánként, másodpercenként akár 1000-2000 spermium) objektív értékelését teszi lehetővé. A spermiumok hordozófolyadékban áramolva lézersugáron haladnak keresztül. A spermiumok által visszavert fény a sejtek méretéről és belső összetettségéről ad információt, a lézer pedig a spermiumokhoz kötődő fluoreszcens festékeket is gerjeszti, lehetővé téve az egyes domének, sejtszervek különböző színnel való jelölését, így a berendezések multiparaméteres analízisre is alkalmasak.

Vizsgálataim során a plazmamembrán-destabilizáció, a mitokondriális membránpotenciál, az akroszóma-integritás és a kromatinstruktúra (DNS-károsodások és kromatinkondenzációs zavarok) flow citométeres értékelését végeztem el.

EREDMÉNYEK ÉS KÖVETKEZTETÉSEK

Vizsgálataim eredményei alapján megállapítottam, hogy a flow citometriára épülő spermológiai analízis hasznos eleme lehet a szaporodásbiológiai kutatólaboratóriumoknak, és a mesterséges termékenyítő állomások rutinszerű, napi spermabírálati rendszerébe is illeszthető.

Kidolgoztam egy új fluoreszcens festékkombinációt a korai membránváltozások (plazmamembrán-destabilizáció) detektálására (Hallap és mtsai, 2006); a spermiumok mitokondriális membránpotenciál-változásainak (a mitokondriumok aktivitásának) mérésére (Hallap és mtsai, 2005a). Egy általunk korábban kifejlesztett hármas fluoreszcens festékkombináció alkalmazásával (amely egyidejűleg jelzi a plazmamembrán és az akroszóma integritását, sérüléseit, Nagy és mtsai, 2003) felderítettem a mélyhűtést, felolvasztást és inszeminációt követő időszakban végbemenő membránváltozások kinetikáját, a plazmamembrán és az akroszóma deteriorációjának időbeli sorrendjét (Nagy és mtsai, 2004).

Megállapítottam, hogy a tenyészbikák kromatinintegritása nem változik az életkor előrehaladtával (Hallap és mtsai, 2005b). A humán andrológia területén standard laboratóriumi technikának tekintett Sperm Chromatin Structure Assay (SCSA) azonban nem bizonyult alkalmasnak a fertilis és szubfertilis tenyészbikák megkülönböztetésére (Nagy és mtsai, 2013). Az SCSA analízis során a DNS fragmentációja mellett értékelhető a spermiumkromatin kondenzáltsági állapota is, amely citogenetikai terheltséget hordozó bikákon végzett vizsgálataink (Révay és mtsai, 2009) szerint alkalmas lehet a spermiumokból történő gyors citogenetikai szűrővizsgálatok elvégzésére (Nagy és mtsai, 2013).

Kidolgoztam egy olyan fluoreszcens kontrasztfestési technikát, amellyel az ondósejtek plazmamembránjának integritása értékelhető úgy, hogy a flow citométeres alkalmazások során a korábbi technikáktól eltérően az élő és elhalt sejtek detektálása azonos detektorral történhet, így a többi detektor szabadon alkalmazható más fluoreszcens próbák jeleinek rögzítésére. Ezen technika alkalmazásával megnyílik a lehetőség olyan multiparaméteres flow citométeres spermológiai tesztek kidolgozására, amelyek egyidejűleg több domén állapotának értékelésére alkalmasak, emellett az élő/elhalt állapot egyidejű értékelése fontos kiegészítője lehet más sejtleletani vizsgálatoknak is, mint például a mitokondriális aktivitás, vagy a kromatinállapot felmérése. A jelenleg folyó és jövőben tervezett kutatásaim egyik fő

irányvonala a multiparaméteres spermatológiai tesztek továbbfejlesztése, az új tesztek fertilitásra vonatkozó diagnosztikai-prognosztikai értékének megállapítása.

TÉZISPONTOK, ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK

1. Az általam kidolgozott fluoreszcens plazmamembrán- és akroszómaintegritási teszt nem igényel speciális minta-előkészítési lépéseket, standard asztali flow citométerrel (kék lézer, zöld, narancssárga és vörös fluoreszcens detektorok) értékelhető, tehát elég egyszerű ahhoz, hogy akár a mesterséges termékenyítő állomások rutin laboratóriumi munkarendjébe illeszthető legyen. A teszt hasznos lehet továbbá új mélyhűtési technikák kidolgozásában is a nekrozis és akroszóma-exocitózis lépéseinek gyors és precíz követésével.
2. A spermiummorfológiai vizsgálat a jövőben is a bikasperma rutin minőségellenőrzésének fontos eszköze lesz, különösen, ha a rutinszerű vizsgálatok a normális morfológiájú ondósejtek arányára koncentrálnak. A major spermiumdefektusok aránya valamelyest gyengébb, de szintén szignifikáns diszkriminatív paraméternek bizonyult, azonban a mesterséges termékenyítő állomások napi gyakorlatában való alkalmazását mégsem ajánlom, mivel az eredmények értelmezése mélyebb spermatológiai ismereteket igényel, és az egyes laboratóriumok, értékelő személyek, alkalmazott mintapreparálási eljárások és osztályozási módszerek eltérései miatt az ismételhetősége gyengébb. A részletes morfológiai vizsgálatok szerepe akkor válik hangsúlyossá, ha az adott egyed a rutin vizsgálat során nem éri el a fentiekben meghatározott küszöbértéket, ekkor az előforduló rendellenességek vizsgálata hasznos információval szolgálhat a spermatogenezis zavarainak feltárásában. Nem szabad azonban figyelmen kívül hagyni, hogy a vizsgálat megfelelő statisztikai erejének biztosítása érdekében mintánként több száz sejt értékelése szükséges. Az SCSA paraméterek meglepően gyenge diagnosztikai értéket mutattak a fertilitás tekintetében. Az SCSA teszt HIGR paramétere azonban hasznos eszköz lehet a kvantitatív kromoszóma rendellenességet (meiotikus zavarok, transzlokációk) hordozó tenyészbikák felismerésére. Azon egyedek esetében, amelyek magas HIGR értéket mutatnak, további, részletes citogenetikai vizsgálatok elvégzése szükséges.
3. Az általam kidolgozott flow citométeres citogenetikai gyorseszttel felismerhetők a kromoszóma traszlokációt heterozigóta formában hordozó és a diploid spermiumokat termelő bikák. A fluoreszcens jelölő kit egyszerűen használható, nem igényel bonyolult minta-előkészítési lépéseket, és az egyszerű asztali flow citométerek standard optikai

rendszerével értékelhető. A Kolmogorov-Smirnov opció a legtöbb flow citométeres adatelemző szoftverben elérhető, így nincs szükség további szoftverbeszerzésre. Az egyes apaállatok, sőt, egyes ejakulátumok is könnyen vizsgálhatók, és a tesztet akkor is használhatjuk, ha a kérdéses állat nem érhető el. A teszt illeszthető az olyan, mesterséges termékenyítő állomásokon működő rutin spermaboratóriumok munkarendjébe, ahol a flow citometriát már alkalmazzák, és a vizsgálatot elegendő a bika élete során egyszer elvégezni.

4. A TUNEL-teszttel végzett DNS-károsodási mérések hamis pozitív eredményei arra hívják fel a figyelmet, hogy a citométer nem képes a fluoreszcens jel helyének (DNS vagy mitokondrium például) lokalizálására, ezért minden flow citométeres kísérlet során kritikus fontosságú a fluoreszcens jelölések mikroszkópos ellenőrzése. A Nicoletti teszt viszont jóval egyszerűbb és gyorsabb, a vizsgálat során nem tapasztaltam hamis pozitív jelölést, diagnosztikai értékének megállapítására azonban a fertilitás tekintetében további vizsgálatok szükségesek.
5. A Merocianin 540/Yo-PRO 1/Hoechst 33342 hármas fluoreszcens festékkombinációja flow citometriával értékelve alkalmas módszer a mélyhűtött-felolvasztott, élő bikaspermiumok membránstabilitásának értékelésére. A plazmamembrán stabilitása szignifikáns korrelációt mutatott több konvencionálisan alkalmazott spermológiai teszttel, mint a motilitás, a spermiumok feji morfológiájának értékelése és a membránintegritás. A swim-up kezelés lehetővé tette annak értékelését, hogy az élő, stabil membránnal bíró spermium alpopuláció milyen mértékben képes kapacitálódásra. A swim-up kezelés alternatív módszer lehet a rutin spermavizsgálati paraméterek tekintetében meglehetősen homogén bikapopulációk egyedei közötti fertilitási rangsor megállapításában.
6. Mind a motilitásvizsgálatok, mind a flow citométeres mérések kimutatták, hogy a swim-up kezelés hatására megnő az intenzív motilitást, illetve magas mitokondriális aktivitást mutató spermiumok aránya a termékenyítő adagban. A MitoTracker Deep Red 633 (M-22426) festéket elsőként alkalmaztam bikaspermiumok értékelésére, és véleményem szerint megfelelő teszt flow citométerrel rendelkező rutin spermavizsgáló laboratóriumokban, tekintve, hogy mintánként több ezer sejtet értékel rövid idő alatt, így objektív alternatívája a szubjektív vagy számítógépes motilitásvizsgálatoknak.

7. Eredményeim szerint már akár 5 °C-os hőmérséklet emelkedés is hatással lehet a halspermiumok mitokondriumainak épségére, működésére. A mitokondriumok membránpotenciál-változásai arra engednek következtetni, hogy a jelen kísérletben alkalmazott inkubációs idő- és hőmérséklet értékek mellett a plazmamembrán-integritással ellentétben a spermiumok szubletális károsodásokat szenvednek, amelyek a konvencionális vitális festési eljárásokkal nem detektálhatók.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Ezúton szeretnék köszönetet mondani társszerzőimnek és munkatársaimnak korábbi (NAIK-ÁTHK Herceghalom) és jelenlegi (PE Georgikon Kar, Állattudományi Tanszék) munkahelyemen.

Külön szeretnék köszönetet mondani a folyamatos együttműködésért, szakmai és baráti tanácsokért Kovács Andrásnak, Husvéth Ferencnek, Bodó Szilárdnak, Magnus Andersson-nak (Finnország), Anders Johannisson-nak (Svédország), Heriberto Rodriguez-Martinez-nek (Svédország) és Révay Tamásnak (Kanada).

Köszönettel tartozom Feleségemnek, Lepossa Anitának a folyamatos és töretlen támogatásért.

A tézisekben ismertetett tudományos munkák pénzügyi háttérét a Swedish Institute (SI), a Royal Swedish Academy of Agriculture and Forestry (KSLA), a Knut and Alica Wallenbergs Foundation, a Swedish Farmers' Foundation for Research in Agriculture (SLF), az Estonian Science Foundation (ESF), az MTA Bolyai Ösztöndíja és az OTKA biztosította.

A TÉZISEKET BIZONYÍTÓ PUBLIKÁCIÓK

1. Nagy S, Hallap T, Johannisson A, Rodriguez-Martinez H. Changes in plasma membrane and acrosome integrity of frozen-thawed bovine spermatozoa during a 4 h incubation as measured by multicolor flow cytometry. *Anim Reprod Sci.* 2004 Feb;80(3-4):225-35.
2. Hallap T, Nagy S, Jaakma U, Johannisson A, Rodriguez-Martinez H. Mitochondrial activity of frozen-thawed spermatozoa assessed by MitoTracker Deep Red 633. *Theriogenology.* 2005 May;63(8):2311-22.
3. Hallap T, Nagy S, Jaakma U, Johannisson A, Rodriguez-Martinez H. Usefulness of a triple fluorochrome combination Merocyanine 540/Yo-Pro 1/Hoechst 33342 in assessing membrane stability of viable frozen-thawed spermatozoa from Estonian Holstein AI bulls. *Theriogenology.* 2006 Apr 1;65(6):1122-36.
4. Nagy ST, Kakasi B, Pál L, Havasi M, Bercsényi M, Husvéth F. Effects of high ambient temperature on fish sperm plasma membrane integrity and mitochondrial activity - A flow cytometric study. *Acta Biol Hung.* 2016 Jun;67(2):125-32.
5. Nagy S, Johannisson A, Wahlsten T, Ijäs R, Andersson M, Rodriguez-Martinez H. Sperm chromatin structure and sperm morphology: their association with fertility in AI-dairy Ayrshire sires. *Theriogenology.* 2013 May;79(8):1153-61.
6. Kakasi B, Nagy S, Pál L, Czimmer GE, Husvéth F. A comparison of alternative assays to measure DNA damage in stallion spermatozoa: TUNEL test versus 'Nicoletti assay'. *Acta Vet Hung.* 2015 Mar;63(1):118-24.
7. Nagy S, Polgár PJ, Andersson M, Kovács A. Quick cytogenetic screening of breeding bulls using flow cytometric sperm DNA histogram analysis. *Acta Vet Hung.* 2016 Sep;64(3):372-379.