



## A kansperma tárolásának történeti áttekintése

**Makkosné Petz B., Kiss R., Bali Papp Á.**

Nyugat-Magyarországi Egyetem Mezőgazdaság- és Élelmiszertudományi Kar, 9200 Mosonmagyaróvár, Vár 4.

### ÖSSZEFOGLALÁS

*A haszonállatok termékenyítő anyagának hosszabb távú tárolása és minőségének ilyen módon történő megőrzése már évszázadokkal ezelőtt is elerendő cél volt az állattartók és nemesítők körében. A mesterséges termékenyítés megjelenésével és elterjedésével párhuzamosan mind a rövidtávú, mind a hosszú távú spermatárolás megoldása nélkülözhetelenné vált. A kezdeti hűtést a fagyasztás váltotta fel, és a XX. század második felében ugrásszerű fejlődésnek indult a spermamélyhűtés. A kutatólaboratóriumokból egymás után láttak napvilágot a különféle spermakezelési eljárások, melyek döntő, lényegi lépései megegyeztek. A hígítás, az ekvilibrálás, a centrifugálás és az adalékanyagok, mint a glicerol, alkalmazása nélkülözhetetlennek bizonyultak. A kutatók egyre jobb fagyasztási és felolvasztási technikákat alkalmaztak, ahol nemcsak a fagyasztást és a felolvasztást oldották meg, hanem azt is, hogy a spermiumok felolvasztás után is életképesek maradjanak. Ez a hetvenes évek elejére több-kevesebb sikerrel megvalósult. A spermiumok életképességének becslésére különféle vizsgálati módszereket dolgoztak ki. Számos festési eljárást fejlesztettek ki, melyeket a mai napig sikeresen alkalmaznak az élő vagy elhalt spermiumok kimutatására, illetve a spermium akroszómája integritásának kiderítésére. A rengeteg kísérlet és kutatás ellenére a hosszú távú spermatárolás nem eléggé magas határfokú, folyamatos kutatómunkával napjainkban is folyik az eljárások tökéletesítése.*

(Kulcsszavak: sertés termékenyítő anyag, fagyasztás, felolvasztás, spermakezelés)

### ABSTRACT

#### History of boar semen conserving methods

B. Makkosné Petz, R. Kiss, Á. Bali Papp

University of West Hungary, Faculty of Agricultural and Food Sciences  
H-9200 Mosonmagyaróvár, Vár 4.

*The sperm conservation of livestock over a long period of time and the conservation of sperm quality was an important purpose to the animal keepers and breeders. The sperm conservation over a short and a long period of time has become indispensable with the appear and spread of insemination. The freezing changed the cooling and the spermcryopreservation made a fast advance in the second part of the 20<sup>th</sup> century. The various laboratories made various sperm treatment methods in that the important steps are similar. Engagement of dilution, conditioning, centrifuging, and inert material like glicerol are indispensable. The scientist used better and better freezing and thawing methods. They had to find a solution for the freeze and thaw. For the estimate of sperm viability were evolved different assay methods. They developed several staining techniques that are in use for the vertification of living or died sperm and integrity of*

*sperm acrosome to date. Despite many experiment and research the sperm storage for a long time has not have enough high efficiency but in recent days with the continues research is going on perfection of methods.*

(Keywords: boar semen, cryopreservation, freezing, thawing, sperm treatment)

## BEVEZETÉS

A sertés tenyésztők évszázadokra visszanyúló fáradalmas munkájának eredményeként a legértékesebb genetikai állománnyal rendelkező sertés kanok és kocák tenyésztődtek ki. Az így létrehozott értékes kanokat egy-egy nem kívánt betegség elpusztíthatja, vagy az idő előrehaladtával az állat fedezésképtelenné válhat, valamint spermájának minősége törvényszerűen romlhat, ezekben az esetekben a megteremtett tenyészérték nem örökíthető tovább. A biológiai sokféleség fenntartása, a kimagasló genetikai állomány – magas szaporulat, betegségekkel szembeni ellenállás, gyors növekedés, ízletes a piaci igényeket kielégítő koleszterinszegény sertéshús – megőrzése nem megoldhatatlan, a kiutat a még élő, értékes kanok spermájának mélyhűtése, génbankok létrehozása, és a már meglévő génbankok fenntartása jelentené.

A spermiumok életképességének hosszabb távú megőrzését már a legelső kísérletekben is hűtéssel érték el. *Spallanzani* (1776) harminc percen át tárolt hóban emberi, csődör és bika spermát azzal a céllal, hogy anyagcseréjük csökkentése révén életüket meghosszabbítsa. Megállapította, hogy a sejtek inaktívvá váltak, majd felengedés után a spermiumok újból életképesnek mutatkoztak. Fagyasztással elsőként *Mantegazza* (1866) foglalkozott,  $-17\text{ °C}$ -ra hűtött le emberi spermiumokat, majd felolvasztotta őket, azt tapasztalta, hogy a sejtek visszanyerték motilitásukat, életképesnek mutatkoztak. Az ő kísérletének a leírása volt az első beszámoló arról, hogy emlős sejtek túléltek a fagyasztás és felolvasztás procedúráját. A technikák fejlődésével napjainkban más állatfajok termékenyítő anyagához hasonlóan a sertés spermiumok mélyhűtése is megvalósítható (*Bali Papp*, 2004).

A glicerol tartósító hatásának felismerése új korszakot nyitott a termékenyítőanyagok tárolásának fejlődésében (*Polge és mtsai.*, 1949), melynek felhasználásával különféle sejteket, szöveteket, közöttük különféle gazdasági állatok gamétáit hűtötték le. Elkezdődtek azok a kutatások, amik a sertés sperma fagyasztásával foglalkoztak (*Polge*, 1956; *Hoffmann*, 1959; *Hess és mtsai.*, 1960; *Dukelow és Graham*, 1962; *Bader*, 1964; *Iida és Adachi*, 1966; *King és Macpherson*, 1966; *Kojima és mtsai.*, 1967; *Rohloff*, 1967; *Bamba és mtsai.*, 1968). Ezekben a kísérletekben a fagyasztott és újra felolvasztott spermiumokat vizsgálták, majd a fagyasztott és felolvasztott spermiumokkal temékenyítési kísérleteket végeztek, bár sorra rossz eredménnyel (*Settergen*, 1958; *King és Macpherson*, 1967; *Dalrymple és Macpherson*, 1969). A hatvanas években végzett kísérletek megalapozták a további kutatómunkát, és a hetvenes évek elejére olyan sertés spermium mélyhűtési eljárásokat dolgoztak ki, melyek során kevésbé csökkent le az élő, ép akroszómájú spermiumok aránya, így a fagyasztott és a visszaolvasztott ejakulátum jobban megőrizte termékenyítő-képességét (*Crabo és Einarsson*, 1971; *Graham és mtsai.*, 1971a,b; *Pursel és Johnson*, 1971a,b). A kutatók az eljárásokat gyakran módosították, és egymás után számoltak be a sikerekről (*Crabo és mtsai.*, 1972b; *Richter és Liedicke*, 1972; *Salamon és Visser*, 1972; *Vincente*, 1972; *Wilmut és Polge*, 1972). *Einarsson* (1973) ismertette az első fagyasztási eljárásokat, valamint azok gyakorlati alkalmazásainak lehetőségeit. Az egyes procedúrák elsősorban a hígítók összetételében és a spermakezelési eljárásokban különböztek. Az egymástól távoli és függetlenül működő laboratóriumokban különféle fagyasztó hígítókkal dolgoztak, más-más

fagyasztás alatti spermakezelési eljárást alkalmaztak, illetve a felolvasztó hígítók is különfélék voltak, valamint a felolvasztási technikák sem voltak egységesek. Az egyes fagyasztási eljárásokhoz egyedi hígítókat fejlesztettek ki, amelyeket más technológiákban nem lehetett alkalmazni (*Osinovo és Salamon, 1976*).

### **A fagyasztás folyamatában használt hígítók**

A fagyasztás során alkalmazott hígítóknak két nagy csoportja ismert: az első csoport a puffer nélküli hígítók. Közös jellemzőjük, hogy mindegyik tartalmaz tojássárgáját és valamilyen monoszacharidot: glükózt (*Polge és mtsai., 1970*) vagy laktózt (*Westendorf és mtsai., 1975*). Használatos puffer nélküli hígítóadalék az Orvus Es Paste (*Westendorf és mtsai., 1975*). Szódium- és triethanolamin lauryl szulfát-tartalma miatt a spermiumok felolvasztás után nagy arányban megőrzik motilitásukat, akroszómaszerkezetük épségét, és a termékenyítő-képességüket (*Pursel és mtsai., 1978*). Mindehhez a tojássárgája jelenléte nélkülözhetetlen, az Orvus emulgeálhatja és diszpergálhatja a tojássárgája lipidjeit, megnövelve a felület/tömeg arányt, ezáltal fokozza az extender és a spermium membránjának fizikai és/vagy kémiai interakcióit (*Pontbriand és mtsai., 1989*).

A másik csoport a puffertartalmú hígítók, amelyekben szerves Tris (hidroximetil)-amino-metán a puffer. További összetevők a monoszacharidok: a fruktóz (*Visser és Salamon, 1974*) vagy a glükóz (*Park és mtsai., 1977, Obando és mtsai., 1984*), az aminosavak közül pedig a glicin (*Obando és mtsai., 1984*), valamint az egyéb szerves molekulák, mint az EDTA (*Visser és Salamon, 1974, Park és mtsai., 1977*). Más pufferes hígítók Zwitterionic Tes-N-Tris (hidroximetil) metil-2-amino-szulfonsav puffert tartalmaznak. Ilyen hígítók a TEST (*Graham és mtsai., 1971a,b*), Bestville F5 (*Pursel és Johnson, 1975*), TES NaK (*Crabo és Einarsson, 1971; Larsson és mtsai., 1977*). A legtöbb hígító izotóniás vagy hipertóniás a szemínális plazmához képest. A hozzáadott cukor mennyiségével szabályozzák az ozmotikus viszonyokat, az ozmotikus nyomást, és a pH értékét úgy állítják be, hogy a lehető legnagyobb mértékben közelítse meg a szemínális plazmában mérhető normál értékeket (*Einarsson, 1971*). A nem pufferolt oldatban a tojássárgája biztosítja a pufferkapacitást. Általános összetevők a cukrok, a proteinek vagy a lipoproteidek, a pufferok, a védőszerek (fagyasztás alatt bekövetkező káros hatások elleni, leginkább glicerol) és az egyéb adalékanyagok. Néhány esetben szemínális plazmát is magába foglal a végső médium (*Salamon és Visser, 1972*).

Számos kutatócsoport saját hígítót fejlesztett ki a sertés sperma mélyhűtéses tárolására (*Polge és mtsai., 1970; Graham és mtsai., 1971b; Crabo és Einarsson, 1971; Visser és Salamon, 1974; Pursel és Johnson, 1971b, 1975; Westendorf és mtsai., 1975; Larsson és Einarsson, 1976; Paquignon és Courot, 1976*). Az egyes hígítók összetétele különbözött egymástól, ennek ellenére csak kevés kísérlet vizsgálta a különféle komponensek pontos szerepét (*Salamon és mtsai., 1973; Visser és Salamon, 1974; Wilmut és Polge, 1977a,b*), így az eltérő pufferokat tartalmazó hígítók közül csak egynéhány volt használható az újabb termékenyítési eljárásokban. *Sarhaddi és mtsai.* (1995) szedimentálással próbálták az ivararányt módosítani, ők az itt alkalmazott hígítók hatásait vizsgálták

### **A fagyasztás alatt alkalmazott spermakezelési eljárások**

Kutatások kimutatták, hogy a fagyasztás és a felolvasztás felére csökkenti a spermiumok mozgékonyosságát (*Tuli és mtsai., 1992*), valamint a túlélő mozgékony szubpopuláció mozgásának minősége gyengébb, mint a friss ejakulátumé (*Verheyen és mtsai., 1993*). A kutatók már évekkal ezelőtt felismerték, hogy az akroszóma sérülések szintén a tárolás és eltartás következményei és valószínű, hogy a glicerol jelenlétének tulajdonítható

(Wilmut és Polge, 1977a,b), ezért a felolvasztás utáni legjobb motilitás és akroszóma integritás elérése érdekében Fiser és Fairfull (1990) maximum 3%-os gliceroltartalmat és 30 °C/perces fagyasztási ütemet írt elő. A 2 és 4% közötti glicerolkoncentrációt mások is javasolták (Almid és mtsai., 1989; Buhr és mtsai., 2001). Hernandez és mtsai. (2007) megállapították, hogy a fagyasztás üteme nem befolyásolta szignifikánsan a fagyasztás és a felolvasztás után mért sperma minőségét. Ők a fagyasztó hígító 3%-os glicerol-koncentrációját, valamint 1800 °C-os melegítési ütemet javasoltak ahhoz, hogy a spermiumok megőrizhessék életképességüket és épségüket. A kapott eredmények más kutatócsoportok vizsgálataihoz hasonlatosak (Almid és mtsai., 1988; Almid és mtsai., 1989; Buhr és mtsai., 2001; Medrano és mtsai., 2002).

A mai napig használt különféle fagyasztási alaptéchnikák döntő lépései lényegében megegyeznek egymással, eltérések elsősorban az ekvibrációs idő hosszában, az egyes fázisok sorrendjében, a spermatöménység beállításában, illetve a hígításban és a fagyasztás ütemében adódhatnak. Mindegyik technika alkalmazza a centrifugálás előtti szemínális plazmában való ekvibrációt, a sperma koncentrációját, a koncentrált formában történő sperma fagyasztását, és az alacsony koncentrációjú glicerol hozzáadását. Az ekvibráció megelőzheti a centrifugálást (Pursel és Johnson, 1975; Larsson és mtsai., 1977). Ők az ekvibrációhoz magát a szemínális plazmát használták, illetve olyan extendert, amely nem tartalmazott szemínális plazmát. Az ekvibrációra azért van szükség, mert elősegíti a spermiumok fagyasztás és felolvasztás alatti károsodásokkal szembeni ellenállását. A rezisztencia kialakulása valószínűleg a spermium membránjának a szemínális proteidekkel való interakciójának köszönhető (Pavelko és Crabo, 1976). A mozgékony spermiumok aránya az ekvibrációs idő előrehaladtával fokozatosan nő, legkevesebb négy és fél órás ekvibrációs időt ajánlanak ahhoz, hogy kielégítő eredmény szülessen. A mozgékonyaság tekintetében a 4%-os gliceroltartalom, a NAR tekintetében a 2%-os gliceroltartalom hozott jobb eredményt (Fiser és mtsai., 1993).

Eriksson és mtsai. (2000) a különböző pihentetési időket vizsgálták a felolvasztás utáni sperma néhány paraméterére. A 10–20 órás pihentetést követően a plazma membrán integritása szignifikánsan megnövekedett a három órás pihentetéshez képest. A 20 órás pihentetés szignifikánsan alacsonyabb számú mozgó spermiumot eredményezett, mint azt a 3 vagy a 10 órás pihentetés tette. Szignifikáns csökkenés volt tapasztalható az előrehaladó mozgást végző spermiumok számában, ugyanakkor szignifikánsan több spermium mozgott körkörösén a hosszabb (10, 20 óra) pihentetést követően. Az átlagos mozgású spermiumok sebessége és az egyenes vonalú mozgású spermiumok sebessége a hosszú pihenő idő után alacsonyabbnak bizonyult a 3 órás pihenőn átesett spermiumokéhoz képest. A centrifugálást vagy a sperma gyűjtésekor (Paquignon és Courot, 1976), vagy az inkubációt követően hajtották végre (Pursel és Johnson., 1975; Westendorf és mtsai., 1975; Larsson és mtsai., 1977).

A fagyasztás célja, hogy csökkentsük vagy akár leállítsuk a spermium anyagcseréjét úgy, hogy a felolvasztás után az anyagcsere károsodás nélkül ismét beindulhasson. A sertés spermium fej plazma membránjának folyékonyaságát a hőmérséklet változása szignifikánsan befolyásolta (Canvin és Buhr, 1989). A spermiumoknak úgy kell túlélniük a fagyasztást, a fagyott állapotban történő tárolást és a felolvasztást, hogy életképességüket megtartsák az eredményes termékenyítés érdekében. Mindhárom fázis alatt az optimális feltételek biztosításával minimálisra csökkenhet a károsodás esélye. Minden tényezőt úgy kell beállítani, hogy együttes hatásuk eredményeként biztosítani tudják a spermiumok épségét. Az egyik ilyen paraméter a spermium-koncentráció. Az alacsonyabb koncentráció ( $0,25 \times 10^9$

spermium/ml) emeli a mozgásképes spermiumok számát, míg a magas koncentráció ( $1 \times 10^9$  spermium/ml) csökkenti (Graham és Crabo, 1972); átlagosan a 0,45 és az  $1 \times 10^9$  spermium/ml töménység a használatos. Szignifikáns összefüggés van a fagyasztás során használt glicerol-koncentrációja és a fagyasztás üteme között. Az alacsonyabb koncentrációjú glicerol hozzáadása gyors lefagyasztást tesz szükségessé (Mazur, 1977). A gyors fagyasztást kezdetben szárazjégbe vajt lyukba cseppentett spermával végezték, ahol a hideg hatására a sperma gömb alakot vett fel, amelyet tárolóedényben, folyékony nitrogénben tároltak (Nagase és Niwa, 1963). A legtöbb kutatócsoport ezt az eljárást használja (Pursel és Johnson, 1975; Paquignon és Courot, 1976; Larsson és mtsai., 1977; Bali Papp és mtsai., 1999).

Többen ampullákban fagyasztották le a sertés spermiumokat, viszonylag lassú hűtési ráta mellett, ekkor a glicerol-koncentrációja meghaladta az 5%-ot. Később (Polge, 1976) gyorsabban végezte a hűtést, alacsonyabb glicerol-koncentráció mellett. Ma már nem használatosak a korábban gömb formában (Wilmut és mtsai., 1973; Cöster, 1978), vagy maxiszalmában (Westendorf és mtsai., 1975; Almid és Johnson, 1988) történő fagyasztási eljárásokat. A jobb eredmények eléréséhez kisebb átmérőjű szalmát kezdtek alkalmazni, ami a fagyasztás és felolvasztás üteméhez jobban tudott alkalmazkodni (Almid és Johnson, 1988; Fiser és Fairfull, 1990). 2 ml-es lapos szalmát Weitze és mtsai. (1988) és Ewert (1988), különféle lapos csomagolást Bwanga és mtsai., (1990) és Berger és Fischerleitner, (1992), Simmet, (1993), 5 ml-es műanyag tasakot pedig Rodriguez-Martinez és mtsai. (1996) alkalmaztak először. A 90-es években használt 0,5 ml-es szalma előnye volt, hogy a fagyasztás során benne egységes jégkristályosodási folyamat ment végbe (Weitze és mtsai., 1987), ami nagyszámú spermium tárolást tett lehetővé (Saravia és mtsai., 2005), jó volt a felolvasztás utáni spermiumtúlélés (Eriksson és mtsai., 2001), és AI-t követő termékenyülést (Roca és mtsai., 2003) biztosított. Eriksson és mtsai. (2000, 2002) sikerrel alkalmazták az általuk kifejlesztett 5 ml-es FlatPack-et számos kansperma fagyasztási és újraolvasztási kísérletben. Saravia és mtsai. (2005) különféle csomagolásokban (0,5 ml-es szalma, összetett FlatPack és hagyományos FlatPack) kis térfogaton és nagy koncentrációban fagyasztott, újraolvasztott sperma minőségét vizsgálták.

A glicerol mennyisége és a felolvasztás közötti összefüggést nem lehet helyesen megbecsülni anélkül, hogy ne vennénk figyelembe a fagyasztás ütemét (Fiser és Fairfull, 1990). Ha összehasonlítjuk az optimálisnál alacsonyabb ütemben ( $1\text{ }^{\circ}\text{C/perc}$ ) fagyasztott spermiumokat az ugyanazon ejakulátumból származó, de  $30\text{ }^{\circ}\text{C/perc}$  gyorsasággal fagyasztott spermiumokkal megállapítható, hogy a gyorsabb fagyasztás jobb eredményeket hozott.

### **A felolvasztás alatt alkalmazott spermakezelési eljárások**

Az évek során a felolvasztási technikák is folyamatosan változtak. Különféle előmelegített oldatokban olvasztották fel a spermagolyócskákat: szemínális plazmában (Crabo és Einarsson, 1971; Crabo és mtsai., 1972b; Einarsson és mtsai., 1973), lefölezött tejben (Einarsson és mtsai., 1972), Hulsenberg-hígítóban (Richter és Liedicke, 1972; Paquignon és du Mensil du Buisson, 1973) és TES-NaK-glükóz-extenderben (Einarsson és mtsai., 1972). A spermiumok túlélése szempontjából a felolvasztási procedúra éppoly fontos, mint a hűtési szakasz (Mazur, 1977). A gyors hűtésből eredő sérülések elsősorban a hűtés gyorsaságától és a spermiumok végső hűtési hőmérsékletétől függenek. Bamba és Cran (1985) kimutatták, hogy a gyors melegítés kevésbé hat a spermiumok motilitására, azonban az akroszomális sérülések nagyobb arányban fordultak elő. Sertéssel végzett tanulmányok (Watson, 1981; Aman és Picket,

1987; Bamba és Cran, 1986) megerősítik a gyors melegítés nemkívánatos hatásait. Fiser és mtsai. (1993) úgy találták, hogy az 1200 °C/perces ütemben történő felolvasztás a legalkalmasabb a 0,5 ml-es szalmában fagyasztott sertés spermiumok esetében. Hernandez és mtsai. (2006) egyértelműen kimutatták, hogy a gyors felmelegítés (1800 °C/perc) megnöveli a spermiumok túlélési esélyeit. Hernandez és mtsai. (2007) jobb DNS aktivitást mértek azokban a sertés spermamintákban, amelyeket 1800 °C/perc körüli sebességgel olvasztottak fel az 1200 °C/perces ütemű felolvasztásokhoz képest.

A pellet formában hűtött spermagolyókat különböző gyorsasággal és eltérő hőmérsékletre olvasztottak és melegítettek fel, hígítva vagy hígítatlanul. A gyorsabb ütem mellett történő felolvasztás kedvezőbbnek bizonyult (Salamon és mtsai., 1973) megállapították, hogy a 37 °C-ra való melegítés előnyösebb volt, mint az ennél alacsonyabb hőmérsékleten, száraz kémcsőben végzett felmelegítés (Larsson és Graham, 1973). Az oldatokban történő felolvasztásos kísérletek sokkal eredményesebbek voltak a felolvasztás utáni ép akroszómájú spermiumok arányának tekintetében, és magasabbak a vemhességi mutatók is (Crabo és mtsai., 1972c; Pursel és Johnson, 1976). Westendorf és mtsai. (1975) maxi szalmákban olvasztottak fel spermát különböző hőfokú vízfürdőkben. A legjobb eredményeket a 90 °C-os vízfürdőben érték el, amikor a sperma hőmérséklete 20–25 °C volt a vízfürdőből való eltávolításkor. A mikrohullámú sütőben történő felmelegítés során a motilitás és az ép akroszómájú spermiumok előfordulása alacsonyabbnak mutatkozott, mint vízfürdőt használva (Ewert, 1988).

A felolvasztó hígítók két nagy csoportba oszthatók: egyik csoport a proteintartalmú szeminális plazma (Crabo és Einarsson, 1971) és a fölözött tej (Einarsson és mtsai., 1972). A másik csoportot a sótartalmú hígítók, mint amilyen a Beltsville felolvasztó folyadék (BTS) (Pursel és Johnson, 1975), a Hulsenberg hígító (Westendorf és mtsai., 1975), az OLEP (Larsson és Einarsson, 1976), az INTRA-ITP (Paquignon és Courot, 1976). Mindegyikben csoportban előfordul cukorkomponens glükóz, laktóz vagy fruktóz. A spermiumok inkubáció utáni túlélésének biztosításához néhányuk EDTA-t is alkalmaztak (Hulsenberg, BTS, INTRA-ITP) (Visser és Salamon, 1974, Westendorf és mtsai., 1975). A felolvasztó hígítók ozmotikus nyomásának és pH-értékének fiziológias szintje nem elég ahhoz, hogy fenntartsa a fagyasztott–felolvasztott spermiumok termékenyítő-képességét (Larsson és Einarsson, 1976). A felolvasztó közeg akkor a legjobb, ha az elektrolitikus-koncentráció magasabb, mint a fagyasztó közegé (Senegacnik és mtsai., 1980). A hígítók közül csak a Hulsenberg hipertónikus, míg a BTS, OLEP és az INTRA-ITP izotónikus. Viszonylag kevés tanulmány vizsgálta az egyes hígítók hatásosságát. Pursel és Johnson (1972) összehasonlította a Hulsenberg, a BL1, a szeminális plazmát, a fölözött tejet és a BTS-t. Közülük a BTS biztosította a legtöbb ép akroszómájú és a motilis spermiumot, bár más vizsgálatok az INTRA-ITP-t jobbnak találták az inkubáció alatti túlélés, a vemhesülési arány és az embrió túlélés tekintetében (Paquignon és Courot, 1976). A legújabb kutatások eredményeként az extenderbe glutationt – L- $\gamma$ -glutamil-L-cisztein-glicin – (GSH) kevernek (Joaquin és Gadea, 2004). A GSH fagyasztó extenderhez való adása nincs szignifikáns hatással a sperma standard paramétereire vagy a sperma felolvasztás utáni termékenyítő-képességére. Azt tapasztalták, hogy a GSH felolvasztó hígítóba adagolása növelte a kanspermiumok termékenyítő-képességét *in vitro* körülmények között, tehát a felolvasztás alatt a GSH olyan spermatulajdonságok megőrzésére képes – valószínűleg megelőzi a membrán sérüléseit –, amelyek eredményes fertilizációt tesznek lehetővé.

### Néhány termékenyítő anyag vizsgálati módszer

A gyakorlatban végzett termékenyítő anyag vizsgálatoknál csak az ejakulátum motilitását állapítják meg. A különböző festési eljárásokkal fény derül az élő/elhalt sejtek arányára és

az akroszóma integritására is, ezáltal képet kaphatunk a sikeres, vagy a kevésbé sikeres jövőbeli termékenyítő-képességről. Számos, az élő/elhalt sejtek megkülönböztetésére szolgáló festési eljárás ismert. A fénymikroszkóppal értékelhető festési eljárások esetében a vitális festék csak az elhalt sejt membránján képes áthatolni, ezáltal jelölni azt, míg a kontrasztfesték a festetlen, azaz élőnek tekintett sejteket fedi fel. A nigrozin-eozinos festést többen használták kisebb módosításokkal (*Blom, 1950; Hancock, 1952; Dott és Foster, 1972*), ami egyszerű morfológiai vizsgálatot tett lehetővé. Az eozin áthatol a halott spermium membránján és a sejtet vörösre festi a bíborszínű nigrozinos háttérrel szemben. Eozin-opálkékét *Lasley és mtsai. (1942)*, eozin-analínkékét *Shaffer és Almquist (1948)*, brómfenolkék-nigrozint *Rauhaus (1990)* használt először.

Az akroszóma állapota differenciált-interferencia-kontraszt (DIC) mikroszkóp segítségével is vizsgálható. Egyéb fénymikroszkóppal értékelhető festési eljárások: eozin B/Fast Green FCF: *Wells és Awa 1970; Giemsa: Hancock 1952, idézi Watson 1975; Procion Printing Green B: Chacarov és Mollova 1976; Spermac: Oettlé 1986; Coomassie kék: Larson és Miller 1999. Talbot és Chacon (1981) kidolgozták a „triple stain” módszert: tripánkékét, mint vitalitást, bengálvöröset és Bismarck barnát, mint akroszómafestéket egyszerre használva. Kovács és Foote (1992) tripánkékét, neutrálvöröset és Giemst kombinálva egy egyszerűbb festési eljárást hozott létre.*

Később sorra jelentek meg a spermiumok életképességét kimutató fluorescens festékeket felhasználó eljárások, melyek a spermavizsgálatok területén számos új lehetőséget teremtettek (*Halangk és Bohnensack, 1982; Garner és mtsai., 1986; Harrison és Vickers, 1990; Althouse és Hopkins, 1995; Johnson és mtsai., 1995; Renard és mtsai., 1995; Garner és mtsai., 1996*). Fagyasztott majd újra felolvasztott sperma vizsgálatára (*Ericsson és mtsai., 1989; Ericsson és mtsai., 1993; de Valcarcel és mtsai., 1994; Borg és mtsai., 1997*), és különböző hígítók összehasonlítására is használták (*Johnsson és mtsai., 1995; Catt és mtsai., 1997*). A fluorescens festékek mikroszkópos (*Althouse és Hopkin,s 1995*), citometrikus (*Halangk és Bohnensack, 1982*) és flow citometrikus (*Ericsson és mtsai., 1989; Graham és mtsai., 1990; Dresser és mtsai., 1993; Evenson és mtsai., 1994; Garner és Johnson, 1995; Catt és mtsai., 1997*) használata több tanulmányban is megjelent. Kezdetben nem (*Kasten, 1980*), a későbbiekben viszont egyre inkább erős kontrasztszínekkel különböztek el egymástól az élő és a holt sejtek (*Narendra, 1986*). Széles körben terjedt el a kettős (*Narendra, 1986*) és napjainkban is használatos hármas festési eljárás (*Nagy és mtsai., 2002*).

A fluorescens festékeket két nagy csoportra lehet osztani: az élő sejteket festő, és a holt sejteket festő festékek. Az élő sejtet kimutató festékek olyan enzimek szubsztrátjai, amelyek csak életképes sejtekben aktívak, illetve olyan festékek, melyek fluoreszkálása működőképes ionpumpa függvénye, azaz csakis életképes sejtekben fluoreszkál. A kalcium-acetilmetil-észter (CAM) és a 6-karboxi-fluoreszcein-diacetát átjut az élő sejt membránján és olyan enzimikus hasítást szenvednek, hogy a sejt zölden fog fluoreszkálni. Általánosan használt működő ionpumpával rendelkező életképes sejtekben nukleinsavhoz kötődő festék a SYBR-14 (*Johnson és mtsai., 1995*). Az élő sejtekben lévő intracelluláris észterázok a permeábilis karboxifluoreszcein-diacetátot nem permeábilis karboxi-fluoreszceinné alakítják és ez által az élő sejtek akroszómája, mitokondriumai, valamint citoplazmája zöld színben fluoreszkál. A nem permeábilis propidium-jodid csak sérült membránú sejtekbe képes bejutni (holt sejtek), ahol inaktív ionpumpa és enzimműködés miatt a karboxifluoreszcein-diacetát nem alakul át karboxifluoreszceinné (elhalt sejtek), így ott a propidium-jodid felhalmozódik, a nukleinsavhoz erősen kötődik, és pirosan fluoreszkál. A holt sejtet kimutató festékek nem képesek átjutni az élő sejt membránján csak a sérült membránon, illetve a holt

sejt membránján. Ezen festékeknek alacsony az extracelluláris fluoreszcenciája, viszont a DNS-hez való fluoreszcens kötődése nagyon magas értéket mutat. Az élő sejtek festékeit és holt sejtek festékeit kombinálva alkalmazzák.

Még árnyaltabb képet kapunk, ha az akroszóma integritását is vizsgáljuk. Ép membránú spermiumok esetén az akroszóma integritás tekintetében a FITC-PSA (fluorescein isothiocianáthoz kötött lektin, azaz földimogyoró nyújt információt (Graham és mtsai., 1990). Az ép akroszómájú sejtek nem, míg a sérült akroszómájú sejtek zöld színben fluoreszkálnak. A hígítóban lévő tojássárgája komponenseknek az élő, ép akroszómájú sejtekhez hasonlóan alacsony fluoreszcenciájuk van, ezért félrevezetően úgy tekintik őket, mint élő, ép akroszómájú spermiumokat. Nagy és mtsai. (2002) a FITC-PSA helyett PE-PNA-t (fikoeritrinhez kötött földimogyoró agglutinin) alkalmaztak. A próba megegyezően hatott a spermium akroszómájára, mint a FITC-PSA, ezért a spermium akroszóma integritásának detektálására alkalmas. A PE-PNA további előnye, hogy a tojássárgája nem kötődik hozzá, mint a PSA-hoz. A kapacitáció állapota klór-tetraciklin (CTC) (Gillan és mtsai., 1997), a spermiumfarok középső részében működő mitokondriumok rodamin 123 (Evenson és mtsai., 1982), MitoTracter Green FM (Garner és mtsai., 1997), JC-1 (5,5',6,6'-tetrakloro-1,1',3,3'-tetraetil-benzimidazolyl-karbocianin-jodid) segítségével értékelhetőek. Huo és mtsai. (2002) fluoreszcens festéssel hígított, hosszú időn át tárolt kansperma életképességét, mitokondriális aktivitását, kapacitációt, valamint az akroszóma épségét vizsgálták. Gadella és Harrison (2002) MITO-t (MitoTracter<sup>TM</sup>) használták annak kimutatására, hogy a bikarbonátnak nincs hatása a kan spermiumok mitokondriumainak működésére. Althouse és Hopkins (1995) sertés sperma életképességét tanulmányozták két fluoreszcens festék kombinációjának alkalmazásával. Hipoozmotikus közegben a spermium membránjának funkcionális állapotát értékelhetjük. A spermiumok farka hipoozmotikus közegben feltekeredik az ozmotikus nyomás kiegyenlítése végett a vízpermeabilis membránján keresztül felvett vízmennyiség miatt. Az elhalt ondósejtek farka hipoozmotikus közegben nem tekeredik fel, ellentétben az élő, ép membránú spermiumfarokkal szemben, így a teszt az élő és holt spermiumok megkülönböztetésére szolgálhat, viszont a spermium egyéb morfológiai értékelését nem tette lehetővé. Nagy és mtsai. (1999) HOST-teszt és Tripán kék-Giemsza festést kombinálva végeztek vizsgálatot kanspermán. Rövid idő alatt nagyszámú sejt (10000 sejt/minta, 1000–2000 spermium/másodperc) mérete, belső összetettsége, élő/elhalt mivolta, akroszómájának épsége, mitokondriumának aktivitása értékelhető az áramlási sejtanalízis segítségével. A spermiumok egyesével jutnak be a citométer mérőkamrájába, ahol lézersugár éri őket. Az általuk visszaverődő fény méretükről, belső szerkezetükről ad információt. A spermiumokhoz korábban kötődő fluoreszcens festékek gerjeszthetők a lézer segítségével, és egyéb más paraméterek vizsgálatára is szolgálhat. Napjainkban akár négy-hat fluoreszcens festék egyidejű használatára is lehetőség van a többlézeres citométerek segítségével.

## KÖVETKEZTETÉSEK

A spermiumok számára a sejtmembrán döntő jelentőségű a fagyasztás–felolvasztás túlélése, és a termékenyítőképeség megőrzése szempontjából is. Optimális túlélést kell biztosítani a plazmamembrán részére az eljárás alatt. A membrán azonban nem egy homogén sejtalkotó, így hasonló kezelésekre a spermiumok különböző részei más-más választ adnak.

A mai napig eredménytelenek a spermium membránjának védelmét biztosító anyagok megtalálására irányuló kísérletek. A glicerol maradt használatban a membránokra gyakorolt ártalmas hatásai ellenére is.



A sertés sperma különös érzékenységet mutat a fagyasztási kezelésekkel szemben. A világ számos laboratóriumában végeztek és végeznek kutatómunkát a sertés sperma hosszantartó tárolásának megoldására. Ennek ellenére még mindig nincs a kezünkben sikeres metodika, ami megközelítené a friss ejakulátummal történő termékenyítési eredményeket, és a fagyasztott sertés sperma *in vivo* termékenyítőképességét pontosan megjósoló *in vitro* módszer sem áll rendelkezésünkre.

## IRODALOM

- Almid, T., Johnson, L.A. (1988). Effects of glycerol concentrations, equilibration time and temperature of glycerol addition on post thaw motility of boar spermatozoa frozen in straws. *J. Anim. Sci.*, 66. 2899-2905.
- Almid, T., Clarke, R.N., Pursel, V.G., Johnson, L.A. (1989). Effectiveness of *in vitro* methods for predicting *in vivo* fertilizing capacity of boar spermatozoa cryopreserved with 2% or 4% glycerol. *Zuchthyg.* 24. 8-15.
- Althouse, G.C., Hopkins, S.M. (1995). Assessment of boar sperm viability using a combination of two fluorophores. *Theriogenology.* 43. 595-603.
- Amann, R.P., Pickett, B.W. (1987). Principles of cryopreservation and a review of cryopreservation of stallion spermatozoa. *J. Equine Vet. Sci.*, 7. 145-173.
- Bader, H. (1964). Untersuchungen über den Einfluss unterschiedlicher Abkühlungszeiten beim Tiefgefrieren von Ebersperma auf die Bewegungsaktivität der Samenzellen. Thesis. Tierärztliche Hochschule, Hannover.
- Bali Papp, Á., Nagy, Sz., Iváncsics, J., Kovács, A., Pécsi, T., Dohy, J. (1999). Comparison of viability and acrosome status of boar spermatozoa frozen on mini or maxi straws – 50<sup>th</sup> Annual Meeting of EAAP. 126.
- Bali Papp Á., Varga E., Kiss V. (2004). Sertés embriók mélyhűtésének lehetőségei. Állattenyésztés és takarmányozás. 53. 167-168.
- Bamba, K., Cran, D.G. (1985). Effect of rapid warming of boar semen on sperm morphology and physiology. *J. Reprod. Fert.*, 75. 133-138.
- Bamba, K., Cran, D.G. (1986). The effect of rapid warming of bull and rabbit semen. *J. Reprod. Fert.*, 82. 501-507.
- Bamba, K., Taniguchi, T., Kojima, J., Iida, I. (1968). Studies on the deep freezing of boar semen. VI. Effects of rapid freezing on survival of boar spermatozoa. *Jap. J. Anim. Reprod.*
- Berger, B., Fischerleitner, F. (1992). On deep freezing of boar semen: investigation on the effects of different straw volumes, methods of freezing and thawing extenders, *Reprod. Dom. Anim.*, 27. 266-270.
- Blom, E. (1950): A one-minute live-dead stain by means of eosin-nigrosin. *Fertil. Steril.* 1. 176-177.
- Borg, K., Colenbrander, B., Fazeli, A., Parlevliet, J., Malmgren, L. (1997). Influence of thawing method on motility, plasma membrane integrity and morphology of frozen-thawed stallion spermatozoa. *Theriogenology.* 48. 531-536.
- Buhr, M.M., Canvin, A.T., Bailey, J.L. (1989). Effects of semen preservation on boar spermatozoa head membranes. *Gamete Res.*, 23. 441-449.
- Buhr, M.M., Iser, P., Bailey, J.L., Curtis, E.F. (2001). Cryopreservation in different concentration of glycerol alters boar sperm and their membranes. *J. Androl.*, 22. 961-969.
- Bwanga, C.O., de Braganca, M.M., Einarsson, S., Rodriguez-Martinez, H. (1990). Cryopreservation of boar semen in Mini- and Maxi-straws, *J. Vet. Med. A.*, 37. 9. 651-658.

- Canvin, A.T., Buhr, M.M. (1989). Effect of temperature on the fluidity of boar spermatozoa membranes. *J. Reprod. Fert.*, 85. 533-540.
- Catt, S.L., O'Brien, J.K., Maxwell, W.M.C., Evans, G. (1997). Assessment of ram and boar spermatozoa during cell storing by flow cytometry. *Reprod. Dom. Anim.*, 32. 251-258.
- Chacarov, E.L., Mollova, M.V. (1976). A one-act differential stain of the acrosome with active dyes. *J. Reprod. Fert.*, 48. 245-246.
- Cöster, C.G.E. (1978): Tiefgefrierkonservierung von Ebersperma in Kunststoffrohren. In vitro Untersuchungen zur Verfahrensverbesserung sowie Besamungsergebnisse nach Anwendung unterschiedlicher Inseminationsmediem und Technicken. Thesis. Tierärztliche Hochschule, Hannover.
- Crabo, B.G., Einarsson, S. (1971). Fertility of deep frozen boar semen. *Acta. Vet. Scand.*, 12. 125-127.
- Crabo, B.G., Brown, K.I., Graham, E.F. (1972a). Effect of some buffers on storage and freezing of boar spermatozoa. *J. Anim. Sci.*, 35. 377-382.
- Crabo, B.G., Einarsson, S., Lamm, A.M., Soosalu, O., Viring, S. (1972b). Studies on the fertility of deep frozen boar spermatozoa. *Proc. VII<sup>th</sup> Int. Congr. Anim. Reprod. & A.I.*, Munich, 2. 1647-1652.
- Crabo, B.G., Graham, W.F., Larson, E.V. (1972c). The influence of thawing methods on frozen boar spermatozoa. *Cryobiology*. 9. 331.
- Cöster, C.G.E. (1978). Tiefgefrierkonservierung Von Ebersperma in Kunststoffrohren. In vitro Untersuchungen zur Verfahrensverbesserung sowie Besamungsergebnisse nach Anwendung unterschiedlicher Inseminationsmediem und Technicken. Thesis. Tierärztliche Hochschule, Hannover.
- Dalrymple, J.R., Macpherson, J.W. (1969). Low temperature preservation of boar spermatozoa. *Can. J. Anim. Sci.*, 49. 45-49.
- Dott, H.M., Foster, G.C. (1972): A technique for studying the morphology of mammalian spermatozoa which are eosinophilic in a differential 'live/dead' stain. *J. Reprod. Fert.*, 29, 443-445.
- Dresser, D.W., Atkins, C.J., Pinder, A., Morell, J.M. (1993). Analyses of DNA content of living spermatozoa using flow cytometry techniques. *J. Reprod. Fert.*, 98. 357-365.
- Dukelow, W.R., Graham, E.F. (1962). Freezing of porcine semen. *J. Anim. Sci.*, 21. 1020-1021.
- Einarsson, S. (1971). Studies on the composition of epididymal content and semen in the boar, *Acta Vet. Scand.*, 36.
- Einarsson, S., Soosalu, O., Swensson, T., Viring, S. (1972). On the fertility and survival of deep frozen boar spermatozoa thawed in skim milk. *Acta. Vet. Scand.*, 13. 446-448.
- Einarsson, S. (1973). Deep freezing of boar spermatozoa. *World. Rev. Anim. Prod.*, 1973. 9. 45-51.
- Einarsson, S., Swensson, T., Viring, S. (1973). A field trial on the fertility of deep frozen boar spermatozoa. *Nord. Vet. Med.*, 25. 372-376.
- Ericsson, S.A., Garner, D.L., Redelman, D., Ahmad, K. (1989). Assessment of the viability and fertilizing potential of cryopreserved bovine spermatozoa using dual fluorescent staining and two-flow cytometric systems. *Gamete Res.*, 22. 355-368.
- Ericsson, S.A., Garner, D.L., Thomas, C.A., Downing, T.W., Marchall, C.E. (1993). Inter-relationship among fluorometric analyses of spermatozoal function, classical semen quality parameters and the fertility of frozen-thawed bovine spermatozoa. *Theriogenology*. 39. 1009-1024.

- Eriksson, B.M., Rodriguez-Martinez, H. (2000). Effect of freezing and thawing rates on the post-thaw viability of boar spermatozoa frozen in FlatPacks and Maxi-straws, *Anim. Reprod. Sci.*, 63. 205-220.
- Eriksson, B.M., Vazquez, J.M., Martinez, E.A., Roca, J., Lucas, X., Rodriguez-Martinez, H. (2001): Effects of holding time during cooling and of type of package on plasma membrane integrity, motility and in vitro oocyte penetration ability of frozen-thawed boar spermatozoa. *Therio.* 55. 1593-605.
- Eriksson, B.M., Petersson, H., Rodriguez-Martinez, H. (2002). Field fertility with exported boar semen freezing into the new FlatPack container, *Therio.* 58. 1065-1079.
- Evenson D.P., Darzynkiewicz Z., Melamed M.R. (1982): Simultaneous measurement by flow cytometry of sperm cell viability and mitochondrial membrane potential related to cell motility. *J. Histochem. Cytochem.* 30. 279-280.
- Evenson, D.P., Thompson, L., Lost, L. (1994). Flow cytometric evaluation of boar semen by the sperm chromatin structure assay as related to cryopreservation and fertility. *Theriogenology.* 41. 637-651.
- Ewert, L. (1988). Versuche zur Vorbereitung von Ebersperma für die Kryokonservierung in Kunststoffröhren und biologisch-physikalische Aspekte beim Auftauendurch Mikrowellen. Thesis. Tier Hochschule, Hannover.
- Fiser, P.S., Fairfull R.W. (1990). Combined effect of glycerol concentration and cooling velocity on motility and acrosomal integrity of boar spermatozoa frozen in 0.5ml straws. *Mol. Reprod. Devel.*, 25. 123-129.
- Fiser, P.S., Fairfull, R.W., Hansen, C., Panich, P.L., Shrestha, J.N.B., Underhill, L. (1993). The effect of warming velocity on motility and acrosomal integrity of boar sperm as influenced by the rate of and glycerol level. *Molec. Reprod. Devel.*, 34. 190-195.
- Gadea, J., Sellés, E., Marco, M.A., Coy, P., Matás, C., Romar, R., Ruiz, S. (2004). Decrease in glutathione content in boar sperm after cryopreservation. Effect of the addition of reduced glutathione to the freezing and thawing extenders. *Therio.* 62. 690-701.
- Gadella, B.M., Harrison, R.A.P. (2002). Capacitation induced cyclic adenosin 3',5'-monophosphate dependent, but apoptosis unrelated, exposure of aminophospholipids at the apical head plasma membrane of boar sperm cells, *Biol. Reprod.*, 67. 340-50.
- Garner, D.L., Dobrinsky, J.R., Welch, G.R., Johnsson, L.A. (1996). Porcine sperm viability, oocyte fertilization and embryo development after staining spermatozoa with SYBR-14. *Theriogenology.* 45. 1103-1113.
- Garner, D.L., Johnsson, L.A. (1995). Viability assessment of mammalian sperm using SYBR-14 and propidium iodide. *Biol. Reprod.*, 53. 276-284.
- Garner, D.L., Pinkel, D., Johnsson, L.A., Pace, M.M. (1986). Assessment of spermatozoal function using dual fluorescent staining and flow cytometric analysis. *Biol. Reprod.*, 34. 127-138.
- Garner, D.L., Thomas, C.A., Joerg, H.W., DeJarnette, J.M., Marchall, C.E. (1997). Fluorometric assessment of mitochondrial function and viability in cryopreserved bovine spermatozoa. *Biol. Reprod.*, 57. 1401-1406.
- Gillan, L., Evans, G., Maxwell, W.M.C. (1997). Capacitation status and fertility of fresh and frozen-thawed ram spermatozoa. *Reprod. Fert. Dev.*, 9. 481-487.
- Graham, E.F., Crabo, B.G. (1972). Some factors influencing the freezing of boar spermatozoa. *Proc. VII<sup>th</sup> Int. Congr. Anim. Reprod. & A.I., Munich.* 2. 1627-1632.

- Graham, E.F., Rajamannan, A.F.I.J., Schmehl, M.K.L., Maki-Laurila, M., Bower, R.E. (1971a). Preliminary report on procedure and rationale for freezing boar spermatozoa. *A.I. Digest*, 19. 12-14.
- Graham, E.F., Rajamannan, A.H.J., Schmehl, M.K.L., Maki-Laurila, M., Bower, R.E. (1971b). Fertility studies with frozen boar spermatozoa. *A.I. Digest*. 19. 16-18.
- Graham, J.K., Kunze, E., Hammertedt, R.H. (1990). Analysis of sperm cell viability, acrosomal integrity, and mitochondrial function using flow cytometry. *Biol. Reprod.*, 43. 55-64.
- Halangk, W., Bohnensack, R. (1982). A quick test for the simultaneous determination of intactness and concentration of spermatozoa. *Acta Biol. Med. Germ.*, 41. 899-905.
- Hancock, J.L. (1952). Cit: Watson, P.F.: Use of a Giemsa stain to detect changes in acrosomes of frozen ram spermatozoa. *Vet. Rec.*, 1975. 97. 12-15.
- Harrison, R.A.P., Vickers, S.E. (1990). Use of fluorescent probes to assess membrane integrity in mammalian spermatozoa. *J. Reprod. Fert.*, 88. 343-352.
- Hernandez, M., Roca, J., Ballester, J., Vazquez, J.M., Martinez, E.A., Johannisson, A. (2006). Differences in SCSA outcome among boars with different sperm freezability. *Int. J. Androl.*, 29. 583-591.
- Hernandez, M., Roca, J., Gil, M.A., Vazquez, J.M., Martinez, E.A. (2007). Adjustments on the cryopreservation conditions reduce the incidence of boar ejaculates with poor sperm freezability. *Therio*. 67. 1436-1445.
- Hess, E.A., Ludwick, T.M., Teague, H.S. (1960). Motility of boar spermatozoa as influenced by semen freezing procedure. *J. Anim. Sci.*, 19. 926-931
- Hoffmann, H.H. (1959): *Versuche zur Frostkonservierung des Ebersamens*. Thesis. Tierärztliche Hochschule, München.
- Huo, L.J., Ma, X.H., Yang, Z.M. (2002). Assessment of sperm viability, mitochondrial activity, capacitation and acrosome intactness in extended boar semen during long-term storage. *Therio*. 58. 1349-60.
- Iida, I., Adachi, T. (1966). Studies on deep freezing of boar semen. I. Effects of various diluents, glycerol levels and glycerol equilibration periods on deep freezing of boar spermatozoa. *Jap. J. Zootec. Sci.*, 37. 411-416.
- Johnsson, L.A., Maxwell, W.M.C., Dobrinsky, JR, Welch, G. (1995). Staining sperm for viability assessment. *Proc. 3rd Int. Congr. on Boar Semen Preservation.*, Blackwell Wissenschafts-Verlag, Berlin, 37-47.
- Kasten, F.H. (1980). Methods for fluorescence microscopy. *Staining Procedures*. Clark G ed. Williams and Wilkins, Baltimore, 39-103.
- King, G.J., Macpherson, J.W. (1966). Boar semen studies. II. Laboratory and fertility of a method for deep freezing. *Can. J. Comp. Med.*, 31. 46.
- Kojima Y., Iida I., Bamba K., Kobayashi S. (1967). Studies on deep freezing of boar semen. Additional effects of DMSO as a cryoprotective agent. *Japan J. Anim. Reprod.*, 13. 149-155.
- Kovács, A., Foote, R.H. (1992). Viability and acrosome staining of bull, boar, and rabbit spermatozoa. *Biotech. And Histochem.*, 67. 119-124.
- Larson, E.V., Graham, E.F. (1973). Measurements of cooling rates and cell survival different points within a sphere. *Cryobiology*, 10. 515.
- Larson, J.L., Miller, D.J. (1999). Simple histochemical stain for acrosomes on sperm from several species. *Mol. Reprod. Dev.* 52. 445-449.
- Larsson, K., Einarsson, S. (1976). Fertility of deep frozen boar spermatozoa. Influence of thaw diluents and of boars. *Acta Vvet. Scand.*, 17. 43-62.

- Larsson, K., Einarsson, S., Bane, A. (1976). The fertility of boar semen frozen by two different methods. Proc. VIII<sup>th</sup> Int. Congr. Anim. Reprod. & A.I. Cracow, 4. 1024-1026.
- Larsson, K., Einarsson, S., Swensson, T. (1977). The development of a practicable method for freezing of boar spermatozoa. Nord. Vet. Med., 29. 113-118.
- Lasley, J.F., Easley, G.T., McKenzie, F.F. (1942). A staining method for the differentiation of live and dead spermatozoa. I. Applicability to the staining of ram spermatozoa. Anat. Rec., 82. 167-173.
- Mantegazza, P.: Sullo sperma umano. Rc. Inst. Lomb. Sci. Lett. 1866, 13, 183-196. Cited by Watson, P.F. (1979). The preservation of semen in mammal. In: Oxford Reviews of Reproductive Biology. Ed. Finn CA. Clarendon, Press, Oxford, 1. 283-350.
- Mazur, P. (1977). The role of intracellular freezing in the death of cells cooled at supraoptimal rates. Cryobiology. 14. 251-272.
- Medrano, A., Watson, P.F., Holt, W.V. (2002). Importance of cooling rate and animal variability for boar sperm cryopreservation: insights from the cryomicroscope. Reprod., 123. 315-322.
- Nagy, Sz., Jansen, J., Topper, E.K., Gadella, B.M. (2002). A triple-stain flow cytometric method to assess plasma- and acrosome membran integrity of cryopreserved bovine sperm immediately after thawing in presence of egg-yolk particles. Biol Repr., 68. 1828-1835.
- Nagase, H., Niwa, T. (1963). Studies on the deep freezing technique for bull semen. III. Deep freezing of bull semen in pellet form. Japan J. Anim. Reprod., 9. 73-77.
- Nagy, Sz., Házás, G., Bali Papp, Á., Iváncsics, J., Szász, F., Szász, F. Jr., Kovács, A., Foote, R.H. (1999). Evaluation of sperm tail membrane integrity by light microscopy. Theriogenology. 52. 1153-1159.
- Narendra, P., Ralph, S., Stephens, E. (1986). A novel technique for viable cell determinations. Stains technology. 61. 315-318.
- Obando, H., Tamayo, T., Alvaro, C. (1984). Evaluation of some factors affecting swine spermatozoa during freezing. Proc. X<sup>th</sup> Int. Congr. Anim. Reprod. A.I. Urbana, 2. 193.
- Oettlé, E.E. (1986). Using a new acrosome stain to evaluate sperm morphology. Food Animal Practice. 263-266.
- Osinowo, O., Salamon, S. (1976). Examination of some processing methods for freezing boar semen. Aust. J. Biol. Sci., 29. 325-333.
- Paquignon, M, du Mesnil du Buisson, F. (1973). Fertilité et proloficite de truies inseminees avec du sperme congele. Comparaison de deux diluurs. J. Rech. Porcine en France. 49-57.
- Paquignon, M., Courot, M. (1976). Fertilizing capacity of frozen boar spermatozoa. Proc. VIII<sup>th</sup> Int. Congr. Anim. Reprod. & A.I, Cracow, 4. 1041-1044.
- Park, H.K., Kim, S.H., Kim, K.J., Choi, K.M. (1977). Studies on the frozen boar semen. I. Studies on the development of diluents for freezing of boar semen. Korean J. Anim. Sci., 19. 260-266.
- Pavelko, M.K., Crabo, B.G. (1976). Possible importance of some sperm coating proteins and their behaviour during preservation of boar spermatozoa. Proc. VIII<sup>th</sup> Int. Congr. Anim. Reprod. & A.I., Cracow, 4. 1045-1048.
- Polge, C. (1956). Artificial Insemination in Pigs. Vet. Rec., 68. 62-76.
- Polge, C. (1976). The fertilizing capacity of boar spermatozoa following freezing and thawing. Proc. VIII<sup>th</sup> Int. Congr. Anim. Reprod. & A.I, Cracow, 4. 1061-1064.
- Polge, C., Salamon, S., Wilmut, I. (1970). Fertilizing capacity of frozen boar semen following surgical insemination Vet. Rec., 87. 424-428.

- Polge, C., Smith, A.U., Parkes, A.S. (1949). Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperature. *Nature*. 164. 666.
- Pontbriand, D., Howard, J.G., Schiewe, M.C., Stuart, L.D., Wildt, D.E.(1989): Effect of cryoprotective diluent and method of freeze-thawing on survival and acrosomal integrity of ram spermatozoa. *Cryobiology*. 26. 341-354.
- Pursel, V.G., Johnson, L.A. (1971a). Procedures for the preservation of of boar spermatozoa by freezing. *U.S. Dept. Agric.*, 44. 227.
- Pursel, V.G., Johnson, L.A. (1971b). Fertilizing capacity of frozen boar spermatozoa. *J. Anim. Sci.*, 33. 1162.
- Pursel, V.G., Johnson, L.A., Schulman, L.L. (1972). Interaction of extender composition and incubation period on cold shock susceptibility os boar spermatozoa. *J. Anim. Sci.* 35. 580-584.
- Pursel, V.G., Johnson, L.A. (1975). Freezing of boar spermatozoa. Fertilizing capacity with concentrated semen and a new thawning procedure. *J. Anim. Sci.*, 40. 99-102.
- Pursel, V.G., Johnson, L.A. (1976). Frozen boar spermatozoa: Methods of thawning pellets. *J. Anim. Sci.*, 42. 927-931.
- Pursel, V.G., Schulman, L.L., Johnson, L.A. (1978). Effect of Orvus ES paste on acrosome morphology, motility and fertilizing capacity of frozen-thawed boar sperm. *J. Anim. Sci.*, 47. 198-202.
- Pursel, V.G., Parks, C.S. (1985). Freezing and thawing procedures for boar spermatozoa. In: L.A. Johnson, K. Larsson. eds. "Deep Freezing of Boar Semen." Uppsala, Sweeden. Swedish University of Agricultural Science. 147-166.
- Rauhaus, H. (1990): Untersuchungen zur Morphologie und Lebend-Tot-Färbung von Spermien einiger Haustierarten. Inaugural-Dissertation, München,
- Renard, P., Drenou, B., Griveau, J.F., Le Lannou, D. (1995). Assessment of acrosome-reacted boar spermatozoa using monoclonal antibody GB 24 and propidium iodide. *Theriogenology*. 43. 927-938.
- Richter, L., Liedicke, A. (1972). Method of deep freezing of boar semen. *Proc. VII<sup>th</sup> Int. Congr. Anim. Reprod. & A.I. Munich*. 2. 1617-1621.
- Roca, J., Carvajal, G., Lucas, X., Va'zquez, J.M., Marty'nez, E.A. (2003). Fertility of weaned sows after deep intrauterine insemination with a reduced number of frozen-thawed spermatozoa. *Therio*. 60. 77-87.
- Rodriguez-Martinez, H., Ericsson, B., Lundeheim, I. (1996). Freezing boar semen in flat plastic bags. Membrane integrity and fertility. III. *Proc. 3<sup>rd</sup> Int. Conf. Deep Freezing Boar Semen. Reprod. Dom. Anim.* 31 Blackwell, Berlin, 161-168.
- Rohloff, D. (1967). Tiefgefrierung von Ebersperma in pelletform bei -196°C. *Zuchtyg.* 2. 75-77.
- Salamon, S., Visser, D. (1972). Insemination with frozen boar semen. *Proc. VII<sup>th</sup> Int Congr. Anim. Reprod. & A.I. Munich*, 2. 1645-1646.
- Salamon, S., Wilmut, I., Polge, C. (1973). Deep freezing of boar semen. I. Effects of diluent composition, protective agents and method of thawning on survival of spermatozoa. *Aust. J. Biol. Sci.*, 26. 219-230.
- Saravia, F., Wallgren, M., Nagy, S., Johannisson, A., Rodriguez-Martinez, H. (2005). Deep freezing of concentrated boar semen for intrauterine insemination: effects on sperm viability. *Therio*. 63. 1320-33.
- Sarhaddi, F., Iváncsics, J., Farkas, Á. (1995). Evaluation of the effect of sedimentation magnetic field on acrosome status of ram spermatozoa. *Acta Agronomica Óváriensis*. 37. 2. 185-191.

- Senegacnik, J., Vengust, M., Bajt, G. (1980). The influence of some freezing and thawing buffers on vitality of thawed boar spermatozoa. Proc. IXth Int. Congr. Anim. Reprod. & A.I. Madrid, 445-448.
- Settergren, I. (1958). Experiments on the Deep-freezing of Boar Semen at -79 C. Proc. VIII<sup>th</sup> Nord. Vet. Congr. Helsingfors, 705-707.
- Shaffer, H.E., Almquist, J.O. (1948). Vital staining of bovine spermatozoa with an eozin-aniline blue staining mixture. J. Dairy Sci., 31. 677-678.
- Simmet, C. (1993). Kältephysikalische Aspekte der Gefrierkonservierung von Ebersperma in ihrer Auswirkung auf Samenqualität und Befruchtungsrate, Thesis, Hannover Veterinary College.
- Spallanzani, L. (1776). Opuscoli di fisca animale e vegetabile. Opuscolo II. Osservazioni e sperienze intorno ai vermicelli spermatici dell' homo e degli animali. Moderna. Cited by Watson, P.F. (1979), in this reference list.
- Talbot, P., Chacon, R.S. (1981). A triple-stain technique for evaluating normal acrosome reactions of human sperm. J. Exp. Zool., 215. 201-208.
- Tuli, R.K., Schmidt-Baulain, R., Holtz, W. (1992). Computer-assisted motility assessment of spermatozoa from fresh and frozen-thawed semen of the bull, boar and goat. Theriogenology. 38. 487-490.
- De Valcarcel, A., las Heras, M.A., Perez, L.J., Moses, D.F., Baldassarre, H. (1994). Fluorescent staining as a method of assessing membrane damage and post thaw survival of ram spermatozoa. Theriogenology. 41. 483-489.
- Verheyen, G., Pletincx, I., VanSteirteghem, A. (1993). Effect of freezing method, thawing temperature and post-thaw dilution/washing on motility (CASA) and morphology characteristics of high-quality human sperm. Hum. Reprod., 8. 1678-1684.
- Vincente, A. (1972). Technology of freezing boar semen. In: Proc. VII<sup>th</sup> Int. Congr. Anim. Reprod. & A.I. Munich, 2. 1623-1628.
- Visser, D., Salamon, S. (1974). Effect of composition of Tris-based diluent on survival of boar spermatozoa following deep freezing. Aust. J. Biol. Sci., 27. 485-497.
- Watson, P.F. (1975). Use of a Giemsa stain to detect changes in acrosomes of frozen ram spermatozoa. Vet. Rec., 97. 12-15.
- Watson, P.F. (1981). The Effects of cold shock on sperm cell membranes. In: Effects of Low Temperatures on Biological Membranes. Ed. Morris GJ, Ciarke A. Academic Press, London, 189-218.
- Weitze, K.F, Fazano, F., Rath, D. (1985). Deep freezing of boar semen in macro- and minitubes. In: Deep Freezing of Boar Semen. Ed. Johnson LA, Larsson K. Swedish Univ. Agric. Sci. Uppsala, 268-269.
- Weitze, K.F., Rath, D., Baron, G. (1987). Nene Aspekte der Tiefgefrierkonservierung von Ebersperma in Plastikröhren. Deutsch. Tierarzt. Wochensch., 94. 485-488.
- Weitze, K.F., Rath, D., Leps, H. (1988). Influence of volume/surface ratio of plastic packages upon freeze-thaw rate and fertility of boar semen. Proc. 11<sup>th</sup> Int. Cong. Anim. Reprod. Insem., Dublin, 3. 312.
- Wells, M.E., Awa, O.A. (1970). New technique for assessing acrosomal characteristics of spermatozoa. J. Dairy Sci., 53. 2. 227-232.
- Westendorf, P., Richter, L., Trew, H. (1975). Für Tiefgefrierung von Ebersperma. Deutsch. Tierarz. Wochenschr., 83. 251-30.
- Westendorf, P., Richter, L., Treu, H. (1975). Zur tiefgefrierung von Ebersperma Labor- und Besamungsergebnisse mit dem Hulsenberger Pailletten-Verfahren. Dtsch. Tierärztl. Wochenschr., 82, 261-300.

- Wilmut, I., Polge, C. (1972). The freezing of boar spermatozoa. Proc. VII<sup>th</sup> Int Congr. Anim. Reprod. & A.I. Munich, 2. 1611-1615.
- Wilmut, I., Polge, C. (1977a). The low temperature preservation of boar spermatozoa. I. The motility and morphology of boar spermatozoa frozen and thawed in the presence of permeating protective agents. Cryobiology. 14, 471-478.
- Wilmut, I., Polge, C. (1977b). The low temperature preservation of boar spermatozoa. II. The motility and morphology of boar spermatozoa frozen and thawed in diluent which contained only sugar and egg yolk. Cryobiology. 14. 479-482.
- Wilmut, I., Salamon, S., Polge, C. (1973).: Deep of boar semen. II. Effects of method of dilution, glycerol concentration, and time of semen-glycerol contact on survival of spermatozoa. Aust. J. Biol. Sci., 26. 231.

Levelezési cím (*Corresponding author*):

**Makkosné Petz Brigitta**

H-9211 Feketeerdő, Dózsa György u. 1.

e-mail: insulin\_hu@yahoo.de