

TÁMOGATÓ INTÉZMÉNY: Nemzeti Fejlesztési Ügynökség

A projekt címe: „Sertés ivarsejtek stresszkezelése: a sertéstenyésztés sebességbe kapcsolása”

A projekt azonosító száma: KMOP-1.1.1-08/1-2008-0065

Támogatási összeg: 79.794.000 Ft

Státusz: folyamatban

Szakterület/iparág bemutatása, a projekt illeszkedése e területhez

Sertéstenyésztés/tenyészállat előállítás

Egy adott állatfaj tenyésztési hatékonysága (genetikai előrehaladás mértéke és sebessége, tenyésztés tértől, időtől való függetlenné válása, nyomon követhetőség, higénia, járványügyi szempontok,...) jelentősen megnövekedik, ha a rutin technológia részévé válik a hím állatok örökítő anyagának jó hatásfokú fagyasztva tárolása. Ez tejelő szarvasmarha tenyésztés esetében, a sertéssel ellentétben, már rutin, egyeduralkodó technológiának számít.

Ezt a megoldást kínálja a sertéstenyésztésnek tenyészállat előállítás céljára a jelen pályázat segítségével létrehozandó technológia, mely magában foglalja az örökítő anyag kinyerésétől, megfelelő hígításától a mélyhűtve tároláson át a felolvasztásig és inszeminálásig tartó folyamatokat. A technológiai sor kidolgozásán kívül a folyamatba illesztett szubletális stressz-kezelés és a hozzá kapcsolódó álló és fogyóeszköz fejlesztés jelenti a projekt újdonságtartalmát.

A kansperma jó hatékonysággal történő, stabil, ismételhető eredményeket hozó fagyasztása jelenleg még megoldatlan feladat, ezért a sertéstenyésztés, ellentétben a szarvasmarha-tenyésztéssel, többnyire lokálisan, helyhez kötötten, viszonylag fix, kisszámú donor felhasználásával zajlik. A világ sertéstenyésztése 99 %-ban a hígított, 15-17 °C-on tárolt sertéssperma inszeminálásán alapul; a fagyasztott sperma aránya a tenyésztésben elhanyagolható, kevesebb mint 1%.

Mindennek oka, hogy

- a mélyhűtött spermiumok felengedést követő túlélése csak ritkán haladja meg a 35-40%-ot, amely a gyakorlatban meghatározott minimumérték: ez alatt az érték alatt a spermát a gyakorlatban nem használják fel inszeminálásra, megsemmisítésre kerül;
- a fagyasztott sperma felengedés utáni életképessége, élettartama jelentősen lecsökken.

A fenti okok ellenére csekély arányban - leginkább kísérlet és génbankolás céljából -, de egy-két helyen foglalkoznak sertéssperma fagyasztással, a következő tapasztalatokkal:

- az alacsony élettartam miatt a rutin technológiába történő beillesztés komoly erőfeszítéseket igényel;
- alacsonyabb vemhesülési arány és
- lényegesen alacsonyabb alomszám.

A pályázat célja egy olyan technológia létrehozása, mely új alapokra helyezi a sertésstenyészést. A létrehozandó új technológia magában foglalja a technológiai sort kezdve a spermavételtől, sperma -hígítástól, -kezeléstől a sperma előkezelésén, fagyasztásán át a felolvasztásig és az inszeminálásig.

Az új technológia „klónoozható”, így termékként egészben, vagy részenként világszerte értékesíthető lenne, mely által a sertésstenyészés - a szarvasmarha-tenyésztéshez hasonlóan- fagyasztott sperma inszeminálásán alapulna.

A pályázó a jelen technológiák hatékonyságát egy, az általa kifejlesztett sejt (sperma) - előkezelési eljárás technológiába illesztésével kívánja megoldani. A többféle örökítő anyagon, embrión és egyéb sejteken sikeresen tesztelt eljárás a sejteket kezelve azok stressz toleranciáját jelentősen növeli, így azok lényegesen nagyobb arányban élnek túl a kezelést követő beavatkozásokat, pl. a mélyhűtést és fagyasztva tárolást.

A létrehozandó technológia megalapozottsága, saját korábbi eredmények

Az örökítő anyag mélyhűtésének lehetősége fél évszázados eredmény. Az elmúlt évtizedek kutatásai ezeknek a mélyhűtési technológiáknak a tökéletesítését és ipari hasznosíthatóságát célozták. Sertésstenyészésben, hasonlóan egyéb állatfajokhoz, ez időre a mélyhűtési protokollokat sikerült optimalizálni, és az általuk elérhető, korábban említett maximum hatékonyságot megközelíteni. A mélyhűtési paraméterek változtatásától jelentős eredményeket már nem vár az iparág.

Sejtek fagyasztva tárolásának területén új megoldásnak számít a pályázó által megalkotott technológia, mely nem a rutin eljárásokat módosítja, hanem a mélyhűtést megelőzően a spermiumokat kezeli egy pontosan kiszámított erős, de maradandó káros következményekkel nem járó (szubletális) stressz hatással, melynek következtében a sejtekben kialakuló válaszreakció hatására életképességük, stressztűrő toleranciájuk jelentősen megnő. Következésképpen a spermiumok fagyasztást követő túlélése is jelentősen nagyobb lesz.

Ennek a szabadalmaztatott eljárásnak a használatával a kansperma fagyasztási hatékonysága jelentősen megnő, ezáltal a fenti hátrányokat kiküszöbölve a túlélés arányát stabilan 40-50% felett tartva a módszer alkalmas a spermafagyasztás iparszerű alkalmazására.

Az 2006-2007ben a pályázó fagyasztott sertéssperma előállítására kísérleti protokollt dolgozott ki a Taiwani Animal Technology Institute-ban. A kísérletek során e projekt alapját meghatározó innovatív eljárással kezelt illetve kezeletlen sertésspermát mélyhűtöttek. A felengedett sertéssperma termékenyítésekor 70-80 % vemhességet értek el mind a kontrol, mind a kezelt sperma esetében, ellenben a malacsám a kezelt sperma esetében szinte megduplázódott (4.4 – 6.7 db/ koca → 9.4 – 10 db/ koca). Az inszeminálásokkal párhuzamosan végzett proteomikai kutatások kimutatták, hogy a kezelés hatására a sertéssperma fehérje profiljában jelentős, a termékenyítőképességre pozitívan ható változások mennek végbe.

A cég korábban egér embrió, mesterséges szarvasmarha embrió, bikasperma modelleken dolgozta ki az új fagyasztási eljárást, mely használatával az embrió és spermafagyasztás hatékonysága jelentősen növelhető. Az eljárás már elfogadott szabadalmi védelem alatt áll.

A szabadalmaztatott eljárás lényege, hogy a technológiában a fagyasztási lépést megelőzően magas (de szubletális, irreverzibilis változásokat nem okozó) hidrosztatikus nyomással kezelik a lefagyasztandó anyagot. Nyomás-előkezelést (szubletális sokkhatás) követően a későbbi stressz-toleranciát jelentősen növelő változások jönnek létre a sejt fehérjeprofiliójában (chaperone család, sokk-fehérjék transzkripciójának beindulása, felgyorsulása, sokk-fehérjék stabilizálása), egyéb biofizikai (membrántranszport, diffúzió) és biokémiai változások mellett. Következésképp az előkezelést követő fagyasztás hatékonysága jelentősen megnő: az ivarsejtek és embriók lényegesen jobban tolerálják a különböző, számukra stresszt, az életképesség gyengülésével járó folyamatokat.

Projekt előrehaladás (2009 nov – 2011 március)

Az első 6 hónapban egymással párhuzamosan elindultak a biológiai, műszaki és műanyagipari fejlesztések. A SZIE Állatorvos-tudományi Karán kialakításra került a kísérleti laboratórium és a donorállomány, mely szolgáltatja az örökítő anyagot a kísérletekhez.

A protokollok kialakításának első lépése volt a már meglévő szakirodalmi adatbázisunk kibővítése illetve konzultációk Európa vezető sertésstenyésztő vállalataival. Mindezen információkra alapozva alakítottuk ki az örökítő anyag kezelési (hígítási és vizsgálati) protokollunkat, egyik kísérleti csoportként a dán modellt is szerepeltetve. Ezen információkra alapoztuk a kezelést végző célgép első koncepciómodelljének méretbeli parametizálását.

Korábbi kísérleti eredményekre alapozva egy már meglévő kísérleti eszközzel kezdtük el az előkészített örökítő anyag kezelési protokolljának meghatározását, és definiáltuk a kezelési paramétereket (kezelés nagysága, időtartama, hőmérséklete, a protokollba illesztés helye és módja, az örökítő anyag kezelésre történő előkészítése). Összesen 36 db kísérleti jegyzőkönyv született, a kezeléseket és a 8 napon át tartó vizsgálatok adataival.

A kísérletek sok olyan új eredményt hoztak, melyek alapvetőek a protokoll iparszerű alkalmazásának kialakításakor.

Eredményként definiálható, hogy a megfelelően végzett kezelés az örökítő anyag in vitro eltarthatóságát jelentősen megnöveli, mely a technológia rutin inszeminálásban történő felhasználhatóságát is megerősíti.

A célgép fejlesztés első lépéseként a konzultációk alapján meghatározott kamratérfogattal (1500 cm³) és hidrosztatikus nyomás kapacitással (400 Atm) bíró koncepciómodell tervei és az eszköz is elkészültek. A meghatározott igényeknek a legyártott modell megfelelőnek bizonyult: az adott térfogaton tartósan képes volt a 400 Atm hidrosztatikus nyomást tartani. E modell képezi szerkezeti alapját a további igényeknek megfelelő fejlesztéseknek.

A biológiai fejlesztés során a korábban leírt kísérleti örökítő anyag-fagyasztási protokoll nagyüzemi használatra történik.

A projekt második szakaszában végzett munka követte a pályázatban meghatározott célt, különös fókusszal arra, hogy az eljárás a világ fejlett sertésstenyésztéssel rendelkező országaiban is piacképes lehessen. A projekt folyamán kísérleti együttműködési kapcsolatot sikerült kialakítanunk a dán sertésstenyésztő vállalat minőségbiztosító és fejlesztő központjával (Danish Agriculture & Food Council, Copenhagen; együttműködésben a Hatting KS mesterséges termékenyítő állomásokkal, mely Európa legnagyobb mesterséges termékenyítő központja). Dánia legnagyobb sertés mesterséges termékenyítő állomásán végeztünk kísérleteket,

bemutatván a jelen projekt céljaként kifejlesztendő technológiát. Az ottani tapasztalatok beépítése a projektbe nemzetközi édekeltségüvé emeli azt.

A projekt első szakaszában a kísérleti feltételek megteremtődtek: donorkanok beszerzése és „betanítása” megtörtént, az örökítő anyag 'state-of-the-art' kinyerése, előkészítése, a megfelelő kezelése illetve a kezelések hatásának korrekt kiértékelése rutin feladattá vált. A második fél évben a dán kísérleti tapasztalatok és megfogalmazott igények alapján változtattunk a használt ivarsejt hígító médiumon, melyre új kezelési protokollt építettünk. A kísérletek folyamán megfogalmazott igények befolyásolták a gépi technológia kutatásának illetve a megfelelő fogyóeszköz kialakításának célparamétereit is.

A kezelést végző céleszköz (számítógéppel vezérelt, autómata, hidrosztatikus nyomást előállító készülék) koncepciómodelljének használata során a nyomáskamra gépészeti rendszerterve elkészült a megfogalmazott igények alapján (4.-5. Tevékenység).

Az in vivo kísérletek előkészítése a magyarországi sertéstelepekkel megtörtént, a magyarországi telepen 2011 szeptemberre be is fejeződik. az utódok kiértékelése folyamatosan zajlik az elléseket követően.