

DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS
TÉZISEI



CSIBA ANITA

MOSONMAGYARÓVÁR

2015

DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS TÉZISEI
NYUGAT-MAGYARORSZÁGI EGYETEM
MEZŐGAZDASÁG- ÉS ÉLELMISZERTUDOMÁNYI KAR
MOSONMAGYARÓVÁR
ÁLLATÉLETTANI ÉS BIOTECHNOLÓGIAI TANSZÉK

*Wittmann Antal Növény-, Állat- és Élelmiszer-tudományi
Multidiszciplináris Doktori Iskola*

Doktori Iskola vezető:
Prof. Dr. Neményi Miklós
egyetemi tanár
az MTA levelező tagja

Ujhelyi Imre Állattudományi Doktori Program

Programvezető:
Prof. Dr. Szabó Ferenc DSc
egyetemi tanár

Témavezető:
Dr. Gergátz Elemér CSc
egyetemi docens

A KOSSPERMA MÉLYHŰTÉS TOVÁBBFEJLESZTÉSE
FÁZISVIZSGÁLATOK EREDMÉNYEI ALAPJÁN

Készítette:
Csiba Anita

MOSONMAGYARÓVÁR

2015

Tartalomjegyzék

1. BEVEZETÉS	4
2. ANYAG ÉS MÓDSZER	6
2.1. Vizsgálatba bevont állatok	6
2.1.1. Kosok	6
2.1.2. Bakkecske	7
2.1.3. Vizsgálatok	7
3. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK	8
3.1. 2-4°C-on hűtött kossperma hűtés során történő élősejtszám % változásának, membrán-és akroszóma elváltozásának, illetve termékenyítőképességének vizsgálata 2007. évi őszi adatok alapján	8
3.1.1. Hígított 2-4°C-on hűtött szaporítóanyag élősejtszám % eredményei 2007	9
3.1.2. Hígított 2-4°C-on hűtött szaporítóanyag eredményei sejtmembrán és akroszóma állapotának 2007. évi vizsgálati eredményei	10
3.1.3. Hígított 2-4°C-on hűtött szaporítóanyaggal történő sikeres termékenyítések százalékos arányának 2007. évi eredmények....	11
3.2. Kossperma fázisvizsgálata membrán- és akroszóma elváltozásainak vizsgálata az előkészítés, mélyhűtés és visszamelegítés során 2008. évi tavaszi adatok alapján.....	11
3.2.1. CTC fluoreszcens festési eljárás.....	12
3.2.2. Fénymikroszkópos vizsgálatok.....	14
3.3. Évszakhatás vizsgálat mélyhűtésre való alkalmasság tekintetében 2008. tavaszi és őszi adatok alapján	16
3.3.1. Évszakhatás vizsgálat során kapott eredmények.....	16
3.3.2. Javaslatok az évszakhatás vizsgálattal kapcsolatban.....	17

3.4. 2009-es eredmények	18
3.4.1. Kossperma mennyisége 2009-es eredmények	18
3.4.2. Dekapacitáló faktorokat tartalmazó visszamelegítő oldatok hatása az élősejtszám % - ra és a dekapacitációra, valamint hőkimerítő próbák alkalmazása 2009. évi adatok alapján	19
3.4.3. Dekapacitáció vizsgálata a különböző összetételű dekapacitáló oldatokban a visszamelegítést követően	20
3.4.4.. Inkubációs kísérletek eredménye 2009	22
4. ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK	25
5. ÉRTEKEZÉS TÉMAKÖRÉBEN PUBLIKÁLT TUDOMÁNYOS KÖZLEMÉNYEK ELŐADÁSOK	28

1. BEVEZETÉS

A kossperma mélyhűtés kérdése napjainkban még nem egyértelműen megoldott. A különböző mélyhűtési eljárásokkal műszalmában és pelletben mélyhűtött termékenyítőanyaggal a visszamelegítést követően az inszeminálás sok esetben kizárólag sebészeti, vagy félsebészeti úton, laparoszkopos eljárással a méhszarvakba juttatott termékenyítő anyaggal lehetséges.

Az ilyen úton történő termékenyítést már 35-40%-os élősejtszámmal rendelkező termékenyítő anyaggal eredményesen lehet végezni, azonban a termékenyítő katéterrel elvégzendő cervikouterinális termékenyítéshez végzett eredményes termékenyítéshez már 60-65%-os élősejtszámmal rendelkező termékenyítő anyagra van szükség. Ennek előállítása pedig nagyon bonyolult feladat. A mélyhűtés során elég ha a rendszerbe egy apró hiba kerül, s az egész napi munka kárba vész. A mélyhűtött termékenyítőanyag előállítása során oda kell figyelni a hígító pontos összetételére, a megfelelő mennyiségére, hogy az előhűtés több lépésben történjen, illetve a krioprotektív anyagot tartalmazó hígító hozzáadására, az equilibráltatási idő betartására, a mélyhűtés sebességére, illetve megfelelő hőmérsékleten és megfelelő összetételű oldatokban történő visszamelegítésre. Azonban a spermiumok termékenyítő képessége nemcsak az élősejtszámtól függ. Ugyanis sok esetben az élő jól mozgó sejtek is átestek már az ún. kapacitációszerű elváltozásokon, illetve akroszóma reakción, amelyek idő előtti bekövetkezése alkalmatlanná teszi őket a termékenyítésre.

Azonban nem szabad elfelejtenünk azt sem, hogy ezek végbemenetele elengedhetetlenül szükséges a termékenyítéshez.

Vizsgálatai során a szerző ezeket az elváltozásokat CTC (klór-tetraciklin-hidrokloridos fluoreszcens festési eljárással vizsgálta. Így a vizsgált minták esetében kiválóan elkülöníthető volt az ép membránnal rendelkező, kapacitációszerű elváltozáson és akroszóma-reakción átesett sejtek aránya. Ezáltal meghatározhatóvá válik, hogy a mélyhűtés mely fázisában történik a spermiumsejtek károsodása és mely lépések azok, ahol változtatni kell. A visszamelegítés során pedig egyértelműen kiderül, hogy mely összetételű visszamelegítő oldat az, amely a legalkalmasabb a mélyhűtés során bekövetkezett kapacitációszerű elváltozás visszafordítására, azaz a dekapacitációra. A fenti vizsgálatokon kívül a mélyhűtés után visszamelegített kossperma életképességének vizsgálata céljából a szerző inkubációs kísérleteket (hőkimerítő próbát) is végzett.

A mélyhűtés módszereinek meghatározásán kívül rendkívül fontos még egy adott állományban a mélyhűtésre alkalmas ejakulátumot termelő megfelelő tenyészkosok nevelése, tartása, takarmányozása, ugratásra szoktatása, rendszeres tréningezése, és a levett termékenyítőanyag minőségének folyamatos ellenőrzése, eredmények rögzítése, hogy a vizsgálat során kiderüljön, mely egyedek szaporítóanyaga alkalmas mélyhűtésre, figyelni kell továbbá azt is, hogy milyen időszakban például az őszi fő-, illetve a tavaszi pótszezonban. Eddigi tapasztalataink szerint az állatok a késő őszi

időszakban termelik a mélyhűtésre legalkalmasabb termékenyítő anyagot. A különböző összetételű visszamelegítő oldatok esetében pedig a dekapacitáló hatást vizsgálta a szerző.

2. ANYAG ÉS MÓDSZER

A szerző a Pharmagene-Farm Kft-nél 2007-2009 közötti időszakban végzett vizsgálatok során a tavaszi és őszi kossperma mennyiségét, minőségét, illetve 2-4°C-os hűtésre, illetve mélyhűtésre való alkalmasságát vizsgálta hét lacaune kos és egy bakkecske bevonásával. A kosok frissen vett spermájának mennyiségét, élősejtszámát, illetve a mélyhűtött és visszamelegített sperma élősejtszámát, valamint a kapacitációszerű membránváltozáson és akroszóma-reakción átesett spermiumsejtek arányát határozta meg a mélyhűtés egyes fázisaiban, a vizsgálatok során a különböző összetételű dekapacitáló oldatok hatékonyságát élősejtszám % meghatározással, valamint a kapacitációszerű elváltozáson, illetve az ép membránnal rendelkező sejtek arányának változásának vizsgálatával, valamint inkubációs kísérletekkel vizsgálta a spermiumsejtek életképességét a visszamelegítést követően.

2.1. Vizsgálatba bevont állatok

2.1.1. Kosok

- 299
- 4012

- 4045
- 4056
- 4245
- 23144
- 23386

2.1.2. Bakkecske

- Jimmy 001

2.1.3. Vizsgálatok

1. 2-4 °C-on hűtött kossperma hűtés során történő élősejtszám % változásainak membrán- és akroszóma elváltozásainak, illetve termékenyítő képességének vizsgálata 2007. év őszi adatok alapján
2. Kossperma fázisvizsgálata membrán- és akroszóma elváltozásainak vizsgálata az előkészítés, mélyhűtés és visszamelegítés során 2008. évi tavaszi adatok alapján
3. Évszakhatás vizsgálata a mélyhűtésre való alkalmasság tekintetében 2008. tavaszi és 2008. őszi adatok alapján
4. Dekapacitációs faktorokat tartalmazó visszamelegítő oldatok hatása az élősejtszám % -ra és a dekapacitációra, valamint hőkimerítő próbák során történő alkalmazás 2009. évi adatok alapján

3. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK

3.1. 2-4°C-on hűtött kossperma hűtés során történő élősejtszám % változásának, membrán-és akroszóma elváltozásának, illetve termékenyítőképességének vizsgálata 2007. évi őszi adatok alapján

2007. év őszén a szerző különböző kosok szaporító anyagainak frissen vett, hígított, illetve 2-4°C-on való tárolás során történő vizsgálatát végezte el. A vizsgálatok között szerepelt fénymikroszkóp alatt történő élősejtszám meghatározás, CTC fluoreszcens festési eljárással történő ép membránnal rendelkező kapacitációszerű elváltozáson, illetve akroszóma-reakción átesett sejtek arányának meghatározása, valamint a különböző kosok szaporító anyagának tesztelése termékenyítésre való felhasználás során, ezen vizsgálatnál külön értékelte a kísérletekhez felhasznált szaporító anyaggal végzett termékenyítések sikerességét, amelynél meglepő módon jobb eredményt kapott, mint a napi gyakorlat során felhasznált termékenyítőanyag esetében. A termékenyítések cervikouterinális módszerrel Milovanov-féle termékenyítő katéterrel történtek. A felhasznált szaporítóanyag frissen vett hígított, valamint 2-4°C-on hűtött kossperma volt. A termékenyítések napjában két alkalommal a reggeli, valamint a délutáni órákban történtek.

3.1.1. Hígított 2-4°C-on hűtött szaporítóanyag élősejtszám % eredményei 2007.

A vizsgálatok során először a közvetlenül a spermavételt követően, majd az azt követő 1, illetve 2 napos 2-4°C-on történő tárolás során történt meg az élősejtszám % meghatározása.

Az eredményeket a szerző alábbi táblázatban közli.

1. táblázat: Kossperma élősejtszámának (%) változása 2-4°C-os tárolás során

Kossperma élősejtszámának (%) változása a 2 - 4 °C-os tárolás során						
Kos száma	4012	4045	4056	4245	átlag	szórás
Napok	Élősejtszám %					
Spermavétel időpontjában	76,15%	77,00%	76,15%	77,27%	76,64%	0,58%
1. nap	70,00%	67,50%	61,67%	71,00%	67,54%	4,18%
2. nap	55,00%	60,00%	55,00%	60,00%	57,50%	2,89%

A vizsgálat eredményeképpen megállapítható, hogy a vizsgált négy minta közül a két napos 2-4°C-on történő tárolást követően két kos, nevezetesen a 4045 és 4245-ös kos szaporító anyagának élősejtszám % átlageredményei alapján 60%-os eredmény volt mérhető, amely azt jelenti, hogy a szaporító anyag általában 2 napos 2-4°C-os tárolás után is alkalmas mesterséges termékenyítésre.

3.1.2. Hígított 2-4°C-on hűtött szaporítóanyag eredményei sejtmembrán és akroszóma állapotának 2007. évi vizsgálati eredményei

A CTC fluoreszcens festési eljárással végzett sejtmembrán és akroszóma vizsgálatnál azonban a 4056-os állat szaporítóanyag bizonyult legjobbnak. A két vizsgálatot összevetve azonban mégis kijelenthetjük, hogy a 4056-os kos termékenyítő anyagával való cervikouterinális termékenyítésre csupán 1 napos 2-4°C-os termékenyítés után javasolható. A 4012, illetve 4045-ös kosok mintáinak átlageredményei esetében szintén a maximum 1 napos 2-4°C-os hűtés utáni termékenyítés javasolható. A 4245-ös minta átlageredményei alapján azonban csupán a frissen hígított spermával történő termékenyítés javasolható, ugyanis a membrán fluoreszcens vizsgálatok eredményei alapján a 4245-ös kos szaporítóanyaga bírta a legkevésbé a 2-4°C-on történő hűtve tárolást. Esetében, ha hűtve tárolásra kerül sor mindenképpen a hígítás során hozzáadott dekapacitáló faktorok használatára van szükség. A legkézenfekvőbb spermavétel után a hígítás előtt közvetlenül 20 V%-os arányban hozzáadott spermaplazma, amely az eredmények javítása céljából az összes többi mintánál is alkalmazható. Mindemellett javasolható magasabb arányú szénhidrát fruktóz, laktóz, gumiarábikum formájában történő hozzáadása a hígítóhoz.

3.1.3. Hígított 2-4°C-on hűtött szaporítóanyaggal történő sikeres termékenyítések százalékos arányának 2007. évi eredményei

A hígított 2-4°C-on hűtött kosspermával az állományban végzett sikeres termékenyítések száma a nem kísérleti célból és nem ivarzásszinkronizált anyajuhokon végrehajtott termékenyítések esetében a 2007-es évben állományszinten 61,59% volt. Érdekes megfigyelni, hogy a kísérletek során termékenyített, illetve ivarzásszinkronizált állatok esetében ez az arány 70,58%. Valószínűleg mindezt a kisebb egyedszám és még a szokásosnál is nagyobb odafigyelés és az ivarzásszinkronizálás eredményezi. Sikeres termékenyítések tekintetében a 4245-ös, 4056-os, illetve 299-es kosok szaporítóanyaga bizonyult leghatékonyabbnak. A kísérleti termékenyítések esetében azonban a 4012-es kos szaporítóanyaga jelentősen jobb eredményt ért el. Összességében elmondható, hogy az átlag feletti eredmények jónak mondhatóak. A kísérleti termékenyítések esetében pedig a szokásosnál is gondosabb munka és nagyobb odafigyelés még jobb eredményt hozott.

3.2. Kossperma fázisvizsgálata membrán- és akroszóma elváltozásainak vizsgálata az előkészítés, mélyhűtés és visszamelegítés során 2008. évi tavaszi adatok alapján

Az eredmények értékelésénél az élősejtszámot, amely alatt az élő és jól mozgó sejtek arányát értjük és a membrán, valamint az akroszóma állapotát egyaránt figyelembe vettük az értékelésnél, hiszen

mindegyik tulajdonság nagymértékben hozzájárul a termékenyítőképességhez.

Az eredményekből látszik, hogy a Jimmy 001-nek nevezett bakkecske spermája bírta legjobban a mélyhűtést, itt átlagban 64,8-61,15 % között volt az ép membránnal rendelkező sejtek aránya. Igaz a mélyhűtés az összes közül a legmagasabb előtt 81%-ról indult.

Az ép sejtmembrán tekintetében jól bírta még a mélyhűtést a 4245, a 23386, a 4012. A 4056-os és 23144-es is jól reagált a dekapacitáló faktorokra.

3.2.1. CTC fluoreszcens festési eljárás

Az „Ép membránnal rendelkező spermiumsejtek százalékos aránya a mélyhűtés egyes fázisaiban” és a „Kapacitáción átesett spermiumsejtek %-os aránya a pelletbe mélyhűtés egyes fázisaiban” – című diagramokról egyértelműen látszik, hogy a mélyhűtés utáni visszamelegítést követően az egyes kosok és a bak spermájára milyen hatással voltak a PBS oldathoz adott dekapacitáló faktorok. (spermaplazma, vérplazma)

Az eredmények alapján rangsoroljuk a kosok és a bak spermájának mélyhűtésre való alkalmasságát. A visszamelegítés során a legjobb eredményt a 299-es ENAR számú kos spermája érte el. Mindkét dekapacitáló faktorra az összes közül a legjobban reagált.

PBS-ben visszaolvastva az ép membránnal rendelkezők közül az utolsó helyre került 29,5%-os eredménnyel, de a dekapacitáló faktorok segítségével 77%, illetve 66%-os az ép membránnal rendelkezők aránya.

A spermaplazma, mint dekapacitáló faktort tartalmazó komponensre a 299, 4012, 4056, 4045 és 23386-os kosok reagáltak jobban, bár meg kell jegyezni, hogy a 23386-os kos hígított szaporító anyagában ép membránnal rendelkező spermiumsejtek aránya a PBS-hez hozzáadott vérsavó esetében sem maradt el sokkal, csupán 1,5%-al a PBS+spermaplazmában történő visszamelegítés eredményeitől.

A vérsavóval, mint dekapacitáló faktort tartalmazó PBS-ben történő visszamelegítés után az előbb említett 23386-os és 23144-es állatok hígított spermája ért el jobb eredményt.

Jimmy 001-es számú bakkecskétől vett mélyhűtés után visszamelegített szaporítóanyag rosszul reagált mindkét dekapacitáló faktorra, ugyanis ez esetben a dekapacitáló faktort tartalmazó komponensek jelenléte a visszamelegítő oldatban ugyan kis mértékben, de csökkentette az ép membránnal rendelkezők arányát. Jelen esetben ez érthető is, mivel itt egy másik állatfaj a juh spermaplazmáját és vérsavóját adtuk a PBS oldathoz. Bizonyára jobb eredményeket kaptunk volna, ha a bakkecskét használjuk. Az mindenesetre megállapítható, hogy még ennek ellenére is viszonylag sok az ép membránnal rendelkezők aránya a PBS-ben visszamelegítetttnél a 2. legjobb, de a „vérplazmával dúsított” oldatban

is a 3. és még a spermaplazmával „dúsítottnál” is az 5. helyen áll a 8 közül. Igaz, hogy a 20°C-os fázisban az ép membránnal rendelkezők aránya Jimmy 001 esetében volt a legmagasabb, szám szerint 81%.

A kapacitáción átesett spermiumok arányáról annyit érdemes megjegyezni, hogy a dekapacitáló faktorokat tartalmazó komponensek különösen a spermaplazma estében az egyes kosoknál és tenyészbaknál elég ránézni a diagramokra, melyeken megfigyelhető, hogy a kapacitáción átesett spermiumsejtek aránya úgy csökken, ahogy növekszik az ép membránnal rendelkezők aránya, tehát úgy látszik, hogy a dekapacitáló faktort ténylegesen tartalmazó oldatok kifejtik hatásukat. A következő kosoknál ez különösen jól látható a diagramokon: 4012, 4045, 4056, 23386, 299-es ENAR számú állatok esetében a spermaplazma dekapacitáló faktorai fejtették ki látványosan hatásukat, 23144-es kosnál pedig a vérsavó dekapacitáló faktorának pozitív hatása figyelhető meg a diagramon.

Az akroszóma-reakción átesettek száma minden esetben látványosan megemelkedett a mélyhűtés utáni visszamelegítést követően.

3.2.2. Fénymikroszkópos vizsgálatok

A fénymikroszkópos vizsgálatok esetén a hígított és mélyhűtés után visszamelegített kossperma élő és jól mozgó sejtjeinek száma alapján tudunk következtetni a termékenyítő képességre.

Az egyes ejakulátumok termékenyítőképességének meghatározása során először a fénymikroszkópos vizsgálatok eredményei alapján

értékeli a szerző az élő és jól mozgó sejtek arányát, majd ezen eredményeket fluoreszcens festés segítségével végzett ép membránnal rendelkező, kapacitáción- és akroszóma-reakción átesett spermiumok arányát határozza meg. A két vizsgálati módszer együtt alkalmazása segítséget nyújthat a mélyhűtött kos- és baksperma termékenyítésre alkalmasságának ellenőrzésében.

Megfelelő visszaigazolást azonban csak a termékenyítési eredmények, ezen belül is az ún. non-return index és az ellési % adhat majd.

2. táblázat: Élő- és jól mozgó spermiumsejtek aránya egyes kosok és bakkecske mélyhűtés előtti és visszamelegítés utáni hígított spermájában

kos-/bak ENAR száma	mélyhűtés időpontja 2008.	Hígított	Visszamelegített		
		20°C-on Élősejt %	PBS-ben Élősejt. %	PBS+spermaplazmában Élősejt%	PBS+vérsavóban Élősejt %
4012	2008.02.26	70-75	15	25	20
	2008.03.04	70	30	30	30
	2008.03.12	70	25	35-40	40
	2008.03.25	70	25	30	20
4045	2008.02.26	75-80	20	25	25
	2008.03.06	70	30	35-40	25
	2008.03.12	65	60	40	25
4245	2008.02.27	70	20	30	25
4056	2008.02.27	70	25	30	30
	2008.03.04	70	35-40	35	30
	2008.03.20	70-75	35	40-45	40-45
23144	2008.03.19	70	15	25	30-35
23386	2008.03.19	65	15	20	25
299	2008.03.20	65	15	25	20
Jimmy 001	2008.03.11	65	20	45	25

Élősejtszám tekintetében a visszaolvaszás után kiemelkedő eredményt ért el a 4056-os számú kos, amely dekapacitáló faktor hozzáadásával 35-40%, sőt esetenként 40-45%-os élősejtszámot is elérte, ami

mélyhűtött kossperma esetében jónak mondható eredmény. Ez a termékenyítőanyag már biztonságosan felhasználható.

A mélyhűtött baksperma esetében az élősejtszám 35-50 % körüli volt. A 4045 ahol a visszaolvasztás utáni élősejtszámot vizsgálva 45-40 %, sőt egy esetben 60 %-os eredmény is született.

A fénymikroszkópos vizsgálatok adatainak elemzése előtt az is megjegyzendő, hogy a kapacitáción átesett kos- és baksperma mozgása élénkül, tehát a mikroszkóp alatt megfigyelhető magasabb élő- és jól mozgó sejtek arányával valószínűleg a kapacitáción átesett spermiumsejtek aránya is növekszik. Ez kis mértékben torzíthatja az eredményeket.

3.3. Évszakhatás vizsgálat mélyhűtésre való alkalmasság tekintetében 2008. tavaszi és őszi adatok alapján

2008. tavaszán és őszén zajlott az évszakhatás vizsgálat. Ezen vizsgálat során meghatározásra került az ejakulátumok mennyisége, élősejtszáma és a mélyhűtés után PBS, valamint különböző dekapacitáló faktorokat tartalmazó oldatokban a visszamelegítést követően a membrán-, illetve akroszóma állapotának vizsgálata is megtörtént.

3.3.1. Évszakhatás vizsgálat során kapott eredmények

- A szerző által végzett ősszel és tavasszal vett kossperma mélyhűtése és visszamelegítése során elvégzett

fázisvizsgálatok eredményeiből kiderül, hogy az őszi sperma jobb minőségű, mélyhűtésre alkalmasabb.

- Létezik szezonális a kosoknál is, amely a klimatikus viszonyoktól, adott féltekén, szélességi körön való elhelyezkedéstől is függ, hiszen Ismaya (2003) vizsgálatai szerint a déli féltekén a nappalok hosszabbodásával nő a kosspermatermelés mennyisége és javul minősége. Ezzel szemben az északi féltekén ősszel van a fő tenyészszezon, amikor a nappalok egyre rövidebbek. A Pharmagene-Farm Kft-nél végzett vizsgálatok eredményei is azt mutatják, hogy az őszi kossperma minősége a jobb. Ez a vizsgálat is azt igazolja, hogy kosoknál is megfigyelhető az évszakhatás.

3.3.2. Javaslatok az évszakhatás vizsgálatával kapcsolatban

- A szerző véleménye szerint további vizsgálatokat kellene végezni az év különböző hónapjaiban, hogy további eredményekkel bizonyítsuk a szezonális létezését a kosoknál is. A szerző frissen vett sperma élősejtszám és spermamennyiség, spermasűrűség, sejtmembrán és akroszóma állapotának együttes vizsgálatát javasolja.
- További javaslatai alapján rögzíteni kellene a klimatikus viszonyokat az év különböző hónapjaiban, különösen a spermavételek időszakában. Klimatikus viszonyok

megfigyelése és rögzítése együtt értékelendő a kossperma minőséggel.

- Sűrűségmérés adataival is ki kellene egészíteni, annak érdekében, hogy teljes képet kaphassunk az évszakok váltakozása és a klimatikus viszonyok spermatermelésre gyakorolt hatásával kapcsolatban.
- A továbbiakban a CTC fluoreszcens festési eljárás mellett a Kovács-Foote féle festési eljárást is érdemes lenne alkalmazni, mivel ez a módszer további információt ad az élő/elhalt sejtek arányáról, motilitásról és az akroszóma-reakción átesett illetve akroszóma hiányos, vagy –sérült sejtek arányáról.

3.4. 2009-es eredmények

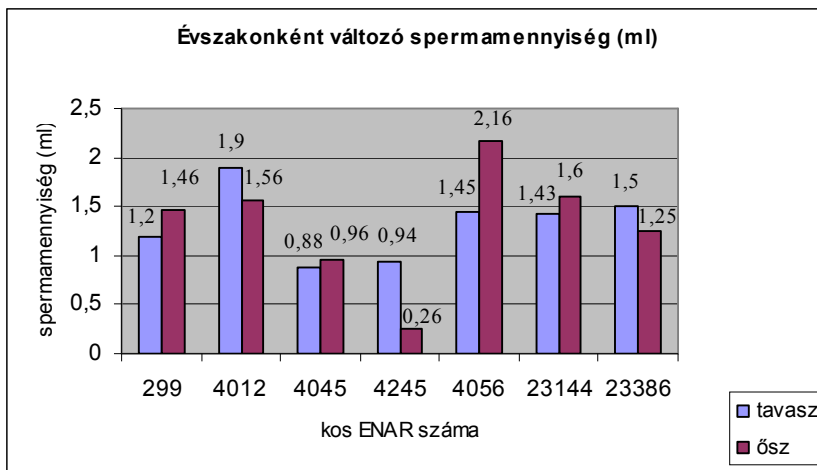
3.4.1. Kossperma mennyisége 2009-es eredmények

Már a 2008-ban végzett vizsgálatok eredményei alapján is megállapítható volt, hogy a tenyészkosoktól a főszezon, azaz őszi folyamán vett minták mennyisége több a tavasziénál. Az őszi minták minősége a két év adatai alapján szintén jobbnak az előzőnél.

3. táblázat: Évszakonként váltakozó átlagos spermamennyiség (ml)

Évszakonként változó átlagos spermamennyiség (ml)							
	299	4012	4045	4245	4056	23144	23386
tavaszi	1,2	1,9	0,88	0,94	1,45	1,43	1,5
ősz	1,46	1,56	0,96	0,26	2,16	1,6	1,25

1. diagram: Évszakonként változó spermamennyiség (ml)



3.4.2. Dekapacitáló faktorokat tartalmazó visszamelegítő oldatok hatása az élősejtszám % - ra és a dekapacitációra, valamint hőkimerítő próbák alkalmazása 2009. évi adatok alapján

Megfigyeléseink szerint a dekapacitáló faktorok szintén hatást gyakorolnak a mélyhűtés után visszamelegített minták élősejtszámára. A dekapacitáló faktorokat tartalmazó oldatokról elmondható, hogy általában pozitív irányban befolyásolják az élősejtszámot, ám esetükben sem mindegy, hogy a visszamelegítő oldatokban egy adott állat szaporító anyagához melyik állat vérsavóját használjuk dekapacitáló faktorokat tartalmazó anyagként.

3.4.3. Dekapitáció vizsgálata a különböző összetételű dekapitáló oldatokban a visszamelegítést követően

4. táblázat: Dekapitáló faktorok élősejtszámra gyakorolt hatása 2009-es minták esetében

Dekapitáló faktorok élősejtszámra gyakorolt hatása 2009-es minták esetében (Átlageredmények alapján)						
Visszamelegítő oldatok	Élősejtszám a különböző vizsgált állapotok mintái esetében (%)					
	4245	4056	4012	4045	23386	23144
Élősejtszám % testhőmérsékleten	68%	69%	68%	65%	58%	60%
Kontrol visszamelegítő oldat: PBS (foszfát puffer oldat)	23%	19%	18%	23%	15%	25%
1. számú visszamelegítő oldat: PBS (foszfát puffer oldat) + spermaplazma	23%	22% (+3%)	13%	38% (+15%)	23% (+8%)	30% (+5%)
2. számú visszamelegítő oldat: PBS (foszfát puffer oldat) + anyajuhtól származó vérsavó (fűlszám: 8181)	16%	9%	0%	Na.	25% (+10%)	Na.
3. számú visszamelegítő oldat: PBS (foszfát puffer oldat) + anyajuhtól származó vérsavó (fűlszám: 8211)	18%	14,38%	0%	Na.	15%	Na.
4. számú visszamelegítő oldat: PBS (foszfát puffer oldat) + kostól származó vérsavó (fűlszám: 4245)	18%	15%	0%	Na.	20% (+5%)	Na.
5. számú visszamelegítő oldat: PBS (foszfát puffer oldat) + kostól származó vérsavó (fűlszám: 4056)	20%	20% (+1%)	16%	30% (+7%)	20% (+5%)	20%
6. számú visszamelegítő oldat: PBS (foszfát puffer oldat) + kostól származó vérsavó (fűlszám: 4012)	20%	10%	1,50%	32,5% (+9,5%)	32,5% (+17,5%)	Na.
Értékelés Élősejtszám növekedés mértéke (%)						Kontrol minták
						10%-20%
						5%-9,9%
						1%-4,9%

5. táblázat: Különböző dekapacitáló faktorokat tartalmazó oldatok hatása a vizsgált csoportba tartozó kosok mélyhűtött szaporító anyagának dekapacitációjára a visszamelegítést követően

Különböző dekapacitáló faktorokat tartalmazó oldatok hatása a vizsgált csoportba tartozó kosok mélyhűtött szaporító anyagának dekapacitációjára a visszamelegítést követően						
Visszamelegítő oldatok	Különböző állatoktól származó mélyhűtött minták esetében elért dekapacitáció a felolvasztás után (%)					
	4245	4056	4012	4045	23386	23144
Kontrol visszamelegítő oldat: PBS (foszfát puffer oldat)	0%	0%	0%	0%	0%	0%
1. számú visszamelegítő oldat: PBS (foszfát puffer oldat) + spermaplazma	1,5% 23% 21% 2% 15%	20% 29% 6%	26% 22%	8% 5,5%	24% 30%	0%
2. számú visszamelegítő oldat: PBS (foszfát puffer oldat) + anyajuhtól származó vérsavó (fülszám: 8181)	20,5% 9,5%	40%	9,5% 6,5%	Na.	23%	0%
3. számú visszamelegítő oldat: PBS (foszfát puffer oldat) + anyajuhtól származó vérsavó (fülszám: 8211)	40%	7,5% 39,5%	7,5% 10,5%	5,50%	4%	0%
4. számú visszamelegítő oldat: PBS (foszfát puffer oldat) + kostól származó vérsavó (fülszám: 4245)	19% 0,5% 19,5% 16,5% 4%	2,5% 29%	20% 2,5%	Na.	Na.	Na.
5. számú visszamelegítő oldat: PBS (foszfát puffer oldat) + kostól származó vérsavó (fülszám: 4056)	2% 21% 2,5% 4% 16,5% 1%	6% 12%	13% 22%	Na.	11,5% 6,5%	0%
6. számú visszamelegítő oldat: PBS (foszfát puffer oldat) + kostól származó vérsavó (fülszám: 4012)	12,5% 24% 7% 7%	14% 31,5%	5,5% 17%	Na.	Na.	0%
Értékelés dekapacitált sejtek aránya (%)						Kontrol minta
					20%<	

A fenti eredmények alapján megállapítható, hogy a spermaplazmát tartalmazó visszamelegítő folyadék szinte kivétel nélkül minden esetben hatékony, azonban a különböző állatoktól származó vérsavók hatékonysága meglehetősen nagy szórást mutat. A megfelelő vérsavó használatával azonban jelentősen növelhető a dekapacitáló oldatok hatékonysága. Gyakorlatban történő felhasználásuk az adott telepen történő előzetesen elvégzett „keresztpróbák” alapján végezhető. A dekapacitáló oldatokhoz érdemes az összes használatban lévő tenyészkostól és több anyajuhtól vett vérmintából vérsavót készíteni és előzetes próbákat végezni. Ezzel növelhető a különböző állatok visszamelegített szaporító anyagához készített visszamelegítő oldatok dekapacitáló hatása.

A továbbiakban érdemes lenne laboratóriumban analízálni a vérsavók összetételét, különösen a HCO_3^- és a Ca^{2+} ion koncentrációját, mivel ezen ionok játszanak fontos szerepet a kapacitáció és akroszóma-reakció során. Ezen kívül az oldatok zsírsav, illetve aminosav összetétele is rendkívül fontos lehet.

3.4.4. Inkubációs kísérletek eredménye 2009

Visszamelegítés után 30-35%-os élősejtszámú minták, 20-27,5%-os élősejtszám eredményeket mutattak 2 órás 39 °C-on történő inkubálás után. Ezen minták laparoszkópos termékenyítésre alkalmasak. A 2009-es minták inkubációs kísérletek eredményei azt mutatják, hogy a mélyhűtött és visszaolvasztott minták cervikouterinális termékenyítésre egyenlőre csupán feltételesen, kizárólag kísérleti

célből használhatóak. Meg kell azonban jegyezni, hogy a 2008-as mélyhűtött és visszaolvasztott kossperma eredményei sokkal jobbak a 2009-es eredményekhez képest. Betudható ez akár az időjárás változásainak is, azonban ezen következtetésekhez további elemzésekre és vizsgálatokra van szükség.

6. táblázat: Hőkimerítő próba során végzett élősejtszám változásának vizsgálata a különböző dekapacitáló faktorokat tartalmazó oldatokban

Hőkimerítő próba során végzett élősejtszám változásának vizsgálata a különböző dekapacitáló faktorokat tartalmazó oldatokban						
	Kosok fűlszáma					
	4245		4012		23386	
Mélyhűtés előtt krioprotektív anyagot nem tartalmazó (I.-es hígítóban)	70%		70%		70%	
Hőkimerítő próba (39°C, 2h)	előtt	után	előtt	után	előtt	után
Kontrol visszamelegítő oldat: PBS (foszfát puffer oldat)	25%	20%	30%	20%	20%	12,5 %
1. számú oldat: PBS (foszfát puffer oldat) + spermaplazma	30%	25%	35%	27,5%	25%	5%
2. számú visszamelegítő oldat: PBS (foszfát puffer oldat) + anyajuhtól származó vérsavó (fűlszám: 8181)	10%	5%	25%	7,5%	7,5%	2%
3. számú visszamelegítő oldat: PBS (foszfát puffer oldat) + anyajuhtól származó vérsavó (fűlszám: 8211)	20%	12,5%	17,5%	10%	17,5%	15%
4. számú visszamelegítő oldat: PBS (foszfát puffer oldat) + kostól származó vérsavó (fűlszám: 4245)	25%	22,5%	30%	27,5%	30%	22,5 %
5. számú visszamelegítő oldat: PBS (foszfát puffer oldat) + kostól származó vérsavó (fűlszám: 4056)	32,5%	17,5%	15%	15%	20%	10%
6. számú visszamelegítő oldat: PBS (foszfát puffer oldat) + kostól származó vérsavó (fűlszám: 4012)	30%	10%	25%	15%	32,5%	22,5 %
Jelmagyarázat	Kontrol minták élősejtszáma%					
	Magasabb élősejtszám %, mint a kontrol minta.					

A fenti eredmények alapján egyértelműen az alábbi következtetések vonható le:

A dekapacitáló faktorokat tartalmazó vérsavó és spermaplazma adalékanyagként történő használata a visszamelegítő oldatokban mindenképpen indokolt, de a vérsavókkal dúsított dekapacitáló faktorok használata egyben nagyon specifikus is. A spermaplazma viszont szinte kivétel nélkül az összes minta esetében javítja az élősejtszámot és a dekapacitáció mértékét a mélyhűtés utáni visszamelegítést követő inkubáció során.

A dekapacitációs folyamat vizsgálata szempontjából a dekapacitáló faktorokat tartalmazó anyagok, gondolok itt a különböző állatoktól anyajuhoktól és tenyészkosoktól származó vérsavók összetételének vizsgálatára, szintén elengedhetetlenül fontos a dekapacitáló faktorokat tartalmazó visszamelegítő oldatok optimális összetételének kidolgozása folyamán. Ez esetben fontos paraméterek lehetnek a kapacitáció szempontjából fontos szerepet játszó ionok (Ca^{2+} , HCO_3^-), továbbá különböző hormonok koncentrációja, valamint a zsírsav- és aminosavösszetétel.

A vizsgálatok folytatása, illetve a Kovács-Foote féle festési eljárással végzett további festés és értékelés, illetve ezen adatok összehasonlítása a CTC fluoreszcens módszerrel történő vizsgálat, illetve élősejtszám eredményekkel mindenképpen javasolható. Ugyanis a Kovács-Foote féle festési eljárással a mozgásképeségről, illetve az akroszóma állapotáról kapunk együttes eredményeket. A

CTC fluoreszcens festési eljárás segítségével csupán a membrán- és akroszóma állapotáról kapunk információt. Az élősejtszám egy külön fénymikroszkópos eljárással végzett vizsgálat eredménye, így nem állapítható meg egy akroszóma-reakción átesett sejtről, hogy mozgásképes e vagy sem. A CTC fluoreszcens festési eljárás előnye viszont, hogy vizsgálható vele a dekapacitáció folyamata. E két festési eljárás együttes alkalmazásával azonban nemcsak több információkhoz jutunk a vizsgált minta minőségére vonatkozóan, hanem további ötleteket adhat a termékenyítőanyag termékenyítésre való alkalmasság vizsgálati módszerének továbbfejlesztéséhez is.

4. ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK

1. A pelletben mélyhűtött lacaune kossperma mintákban a sejtek dekapacitációjának bekövetkezése a kontroll visszamelegítő oldatban (PBS, foszfátpuffer oldat) meghatározott ép membránnal rendelkező és kapacitáción átesett sejtek arányához viszonyítva a kapacitáción átesett sejtek arányának csökkenésének, illetve az ép membránnal rendelkező sejtek növekedésének vizsgálatával határozható meg. Amennyiben a dekapacitáló faktorokat tartalmazó visszamelegítő oldatokban (PBS + sperm plazma, PBS + vérsavó) a kontroll oldatként szolgáló PBS oldatban jelenlévő ép membránnal rendelkező, illetve kapacitáción átesett sejtek arányához képest az ép membránnal rendelkező sejtek aránya egyidejűleg növekszik, a dekapacitáción átesett sejtek arányának csökkenésével, akkor beszélhetünk dekapacitációról.

2. A dekapacitáció mértéke a kontrol oldatként szolgáló, foszfátpuffert tartalmazó visszamelegítő oldatban (PBS) jelenlévő ép membránnal rendelkező és kapacitáción átesett sejtek arányához viszonyítva az adalékolt dekapacitáló faktorokat tartalmazó oldatokban (PBS + sperm plazma, PBS + vérsavó) az ép membránnal rendelkező sejtek arányának növekedésével határozható meg, azzal a feltétellel, hogy a kapacitációszerű elváltozáson átesett sejtek aránya legalább annnyival csökken, mint amennyivel az ép membránnal rendelkező sejtek aránya növekszik.

3. A pelletben mélyhűtött majd visszaolvasztott lacaune kossperma minták esetében a foszfátpuffert tartalmazó sperm plazmával adalékolt visszamelegítő oldat élősejtszámra és kapacitációs állapotra gyakorolt hatásának vizsgálata során a szerző azt tapasztalta, hogy a sperm plazmával adalékolt foszfátpuffer tartalmazó visszamelegítő oldat a pelletben mélyhűtést követően visszamelegített lacaune kossperma minták esetében az élő és jól mozgó spermiumsejtek arányára és azok kapacitációs állapotára egyaránt pozitív hatással volt.

4. A szerző által végzett vizsgálatok eredményeként megállapítható volt, hogy a visszamelegítő oldatban adalékanyagként használt vérsavó javíthatja a pelletben történő mélyhűtés után visszamelegített lacaune kossperma élősejtszámát, illetve dekapacitációs állapotát. A különböző állatoktól származó vérsavók

hatása azonban nagyon specifikus. Egyedenként tejesen eltérő hatást érhetünk el.

5. A visszamelegítő oldathoz adalékolt vérsavó mélyhűtés után visszamelegített lacaune kossperma élősejtszámára, illetve kapacitációs állapotára gyakorolt hatása a különböző állatoktól származó vérsavók különböző összetételétől függ. Nagy valószínűség szerint a Ca^{2+} , illetve HCO_3^- koncentrációjától függ a legnagyobb mértékben, mivel ezek az ionok játszanak szerepet a kapacitáció és akroszóma-reakció lejátszódásában.

6. Megállapítható, hogy az ősszel, illetve tavasszal vett ejakulátumokból készített spermaplazma egyaránt felhasználható a visszamelegítő oldatokban dekapacitáló faktorokat tartalmazó természetes adalékanyagként. Domingez és mtsai. (2008) szerint ugyanis kizárólag az ősszel vett szaporító anyagból előállított spermaplazma hatékony dekapacitáló adalékanyagként.

7. A szerző által végzett vizsgálatok alapján megállapítható, hogy az őszi főszezonban a vizsgált lacaune kosok ejakulátumában előforduló akroszóma-reakción átesett sejtek százalékos aránya magasabb, mint a tavaszi pótszezonban.

5. ÉRTEKEZÉS TÉMAKÖRÉBEN PUBLIKÁLT

TUDOMÁNYOS KÖZLEMÉNYEK ELŐADÁSOK

Tudományos folyóiratokban megjelent cikkek

Angol nyelvű cikkek, külföldi megjelenés lektorált folyóiratokban

Csiba Anita – Gyökér Erzsébet– Gergátz Elemér- Gombkötő Nóra: Effect of semen plasma and blood serum for motility % and capacitation status of cryopreserved and thawed ram semen – The Experiment Journal 2015.,Vol. 34(4), 2150-2161 (ISSN 2319-2119)

Csiba Anita – Gyökér Erzsébet– Gergátz Elemér- Gombkötő Nóra: Comparative examination of deep-frozen ram semen after thawing and incubating in different solution - International Journal of Applied Science and Technology Vol. 5. No. 6. 2015.12.31. (ISSN 2221-0997)

Magyar nyelvű lektorált folyóiratban

Szabados Tamás – Gergátz Elemér – Gyökér Erzsébet – **Csiba Anita** – Gyimóthy Gergely – Németh Attila – Mihályfi Sándor (2008): A külső méhszáj alakulások és a termékenyítő katéter bejuttathatóságának vizsgálata lacaune juhállományban. - Állattenyésztés és Takarmányozás. 57. 1. 55-64. p.

Magyar nyelvű lektorált egyetemi folyóiratban

Szabados Tamás – Gergátz Elemér – Gyökér Erzsébet – Németh Attila – Mihályfi Sándor – **Csiba Anita** - Gyimóthy Gergely (2008): Az ejakulátumok mennyiségének vizsgálata lacaune kosoknál. - Acta Agronomica Óváriensis., 50. 2. 67-78. p.

Konferencia részvételek

Nemzetközi konferencia részvétel, idegen nyelvű előadás

Gergátz Elemér – Gyökér Erzsébet – Csiba Anita – Németh Attila: Quality of the deepfrozen buck semen produced in pellet form and mini-straw – European Regional Conference on Goats 2014 7-13 April 2014 Debrecen – Hungary, Oradea – Romania 88 p.

Magyar nyelvű előadások

Csiba Anita – Németh Attila – Mihályfi Sándor (2008): Kos- és bakspermiumok kapacitációszerű elváltozásainak és akroszóma-reakcióinak vizsgálata fluoreszcens festési eljárás segítségével. - XXXII. Óvári Tudományos Nap – Élelmiszergazdaságunk Kérdő Jelei Napjainkban Nemzetközi Konferencia, Mosonmagyaróvár, 2008. október 9. (ISBN 978-963-9883-05-5 Konferencia kiadvány)

Csiba Anita - Gyökér Erzsébet - Németh Attila - Mihályfi Sándor (2009): Őszi és tavaszi kossperma mélyhűthetőségének összehasonlítása – XV. Ifjúsági Tudományos Fórum, Keszthely 2009. április 16. (ISBN 978-963-9639-33-1 Konferencia kiadványban jelent meg a teljes szöveg)

Csiba Anita - Gergátz Elemér - Gyökér Erzsébet - Németh Attila - Mihályfi Sándor: Tavaszi és őszi kossperma mennyiségének, minőségének, valamint mélyhűthetőségének összehasonlítása - LIII. Georgikon Napok nemzetközi tudományos konferencián elhangzott előadás – 2011. szeptember 29. (ISBN 978-963-9639-44-7 kiadvány 187-197. p.)

Csiba Anita – Gergátz Elemér: Kossperma mélyhűtés módszereinek összefoglaló vizsgálata - LIV. Georgikon Napok nemzetközi tudományos konferencián elhangzott előadás – 2012. október 7-8. (ISBN 978-963-9639-48-5 kiadvány 112-125 p.)

Poszter publikációk

Idegen nyelvű poszter publikációk

Csiba Anita - Gergátz Elemér: Improvement the cryopreservation of ram semen based on the result of phase experiments – Pannon Egyetem Georgikon kara által rendezett LV. Georgikon Napok, 2013. szeptember 26-27. (ISBN 978-963-9639-52-2 kiadvány 39p.)

Magyar nyelvű poszter publikációk

Csiba Anita – Németh Attila – Mihályfi Sándor (2008): A fluoreszcens spermafestési eljárás bemutatása – poszter XXXII. Óvári Tudományos Nap – Élelmiszergazdaságunk Kérdő Jelei Napjainkban Nemzetközi Konferencia, Mosonmagyaróvár, 2008. október 9. (ISBN 978-963-9883-05-5 Konferencia kiadvány)

Csiba Anita - Gergátz Elemér - Gyökér Erzsébet: Kossperma mélyhűtésre való alkalmasságának vizsgálata minőségének megőrzése és ellenőrzése a mélyhűtés különböző fázisaiban poszter- XXXIV. Óvári Tudományos Nap Magyar Mezőgazdaság – lehetőségek, források, új gondolatok c. konferencia, 2012. október 5. (ISBN-978-963-9883-93-2 kiadvány 355-362 p.)