

DOKTORI (Ph.D.) ÉRTEKEZÉS

Dr. Pálfyné Dr. Vass Nóra

DEBRECEN

2014.

DEBRECENI EGYETEM
MEZŐGAZDASÁG-, ÉLELMISZERTUDOMÁNYI ÉS KÖRNYEZETGAZDÁLKODÁSI KAR
ÁLLATTUDOMÁNYI, BIOTECHNOLÓGIAI ÉS TERMÉSZETVÉDELMI INTÉZET

ÁLLATTENYÉSZTÉSI TUDOMÁNYOK DOKTORI ISKOLA

Doktori Iskola vezető:
Dr. Kovács András
egyetemi tanár, az MTA doktora

Témavezetők:
Dr. Jávor András
CSc

Dr. Cseh Sándor
DSc

**A JUH EMBRIÓÁTÜLTETÉS EREDMÉNYESSÉGÉT BEFOLYÁSOLÓ
TÉNYEZŐK**

Készítette:
Dr. Pálfyné Dr. Vass Nóra
doktorjelölt

Debrecen
2014.

**A JUH EMBRIÓÁTÜLTETÉS EREDMÉNYESSÉGÉT BEFOLYÁSOLÓ
TÉNYEZŐK**

Értekezés a doktori (Ph.D.) fokozat megszerzése érdekében
az állattenyésztési tudományok tudományágban

Írta: **Dr. Pálfyné Dr. Vass Nóra** állatorvos-doktor

Készült a Debreceni Egyetem Állattenyésztési Tudományok doktori iskolája
(Szaporodásbiológia, Genomika doktori programja) keretében

Témavezetők: **Dr. Jávor András CSc**

Dr. Cseh Sándor DSc

A doktori szigorlati bizottság:

elnök: Dr.

tagok: Dr.

Dr.

A doktori szigorlat időpontja: 20..... hó nap

Az értekezés bírálói:

Dr.

Dr.

A bírálóbizottság:

elnök: Dr.

tagok: Dr.

Dr.

Dr.

Dr.

Az értekezés védésének időpontja: 2014.....

Tartalomjegyzék

1. Bevezetés	1
1.1. Bevezetés	1
1.2. Célkitűzések	3
2. Irodalmi áttekintés	5
2.1. Asszisztált reprodukciós technikák (ART)	5
2.2. Mesterséges termékenyítés (MT)	8
2.2.1. A MT előnyei és hátrányai	8
2.2.2. A kossperma gyűjtése, értékelése és feldolgozása	9
2.2.3. Termékenyítési technikák a juhtenyésztésben	11
2.3. Embrióátültetés (EÁ)	14
2.3.1. Génmegőrzés	15
2.3.2. A juh EÁ története, a nemzetközi helyzet és a hazai eredmények	15
2.3.3. A juh EÁ programokban szereplő donor és recipiens állatok előkészítése	17
2.3.4. Ivarzásszinkronizáció és szuperovuláció	18
2.3.5. A szuperovuláció eredményességének kapcsolata a petefészek folliculáris státuszával	21
2.3.6. A laparoszkópos embriókinyerés és EÁ	22
2.3.7. A sebészi embriókinyerés és EÁ	24
2.3.8. Juvenile in vitro embryo transfer	25
2.4. Embriómélyhűtés	26
2.4.1. Az embriómélyhűtés előnyei	26
2.4.2. Az embriómélyhűtés módszerei	27
2.4.3. Krioprotektív anyagok	27
2.4.4. A vitrifikáció	28
2.5. A juh embrióátültetés eredményessége és a programban szereplő donor és recipiens állatok tartása és takarmányozása közötti kapcsolat	31
2.5.1. A túletetés káros hatásai a szaporodásbiológiában	32
2.5.2. Az elégtelen tápanyagellátás	32
2.6. A juh embrióátültetés eredményessége és a vér progeszteron (P4) szintjének alakulása	34
2.7. A juh embrióátültetés eredményességét befolyásoló új tényezők: metabolikus	

hormonok perifériás vérben mért szintje	35
2.7.1. IGF-1 és inzulin	35
2.7.1.1. Az IGF-1 és inzulin termelődése és a takarmányozás kapcsolata	36
2.7.2. Az IGF-1 perifériás vérben mért szintje kérődzőkben	38
2.7.3. T3 (trijódtironin) és T4 (tiroxin) perifériás vérben mért szintje és a reprodukció közötti összefüggések	40
3. Anyag és módszer	42
3.1. A vizsgálatban részt vevő fajta, a magyar merinó bemutatása	42
3.2. A kísérlet helyszínének bemutatása	43
3.3. A „Piaci igényeknek és az éghajlatnak megfelelő juhok tenyésztése és nemesítése” című NKTH projekt és a disszertáció kapcsolata	43
3.4. A kísérleti anyajuhok kiválasztása, tartása és takarmányozása	44
3.5. Az embriótranszfer program és a műtétek elvégzésének helye	46
3.6. Az embriótranszfer programok végrehajtása	46
3.6.1. A vérmintagyűjtés	50
3.6.2. A mesterséges termékenyítés (MT)	52
3.6.3. Az embriókinyerés	54
3.6.4. Az embrióátültetés (EÁ)	55
3.7. A vizsgálatok során alkalmazott statisztikai módszerek	56
4. Eredmények	57
4.1. Az embrió-átültetési programok eredményeinek bemutatása	57
4.1.1. 2009. február, tenyészszézonban végzett EÁ program	57
4.1.2. 2009. április, szézonon kívüli időszak	60
4.1.3. A 2010. februári EÁ program, szézonon belül	62
4.1.4. A 2010. áprilisi EÁ program, szézonon kívül	65
4.2. A juh embrió-átültetési programok és a takarmányozás kapcsolata	69
4.2.1. A 2009. és 2010. áprilisi programok donor állataiból vett vérminták anyagforgalmi paramétereinek vizsgálati eredményei I.	69
4.2.2. A 2009. és 2010. áprilisi program donor állataiból vett vérminták anyagforgalmi paramétereinek vizsgálati eredményei II.	73
4.3. A donor és recipiens állatok metabolikus hormonvizsgálati eredményei	83
4.3.1. A 2009. februári (szézonon belüli) program eredményei	84
4.3.1.1. A 2009. februári (szézonon belüli) program recipiens	

anyajuhainak eredményei	84
4.3.1.2. A 2009. februári (szeznon belüli) program donor állatainak eredményei	85
4.3.2. A 2010. év eredményei szezonon belül (2010. február)	87
4.3.2.1. A 2010. februári programban részt vett recipiens anyajuhok eredményei	87
4.3.2.2. A 2010. februári program donor anyajuhainak eredményei	88
4.3.3. A 2010. áprilisi (szeznon kívüli) program eredményei	90
4.3.3.1. A 2010. februári programban részt vett donor anyajuhok eredményei	90
4.3.4. A 2009. és a 2010. évben végzett vizsgálatok összevont eredményei szezonon belül	90
4.3.4.1. A recipiens anyajuhok összevont vizsgálati eredményei (2009. és 2010. február)	90
4.3.4.2. A donor anyajuhok eredményei az összevont vizsgálatokban	91
4.3.5. A szezonon belüli és a szezonon kívüli időszak összehasonlítása	93
4.3.5.1. A donor anyajuhok perifériás vérben mért hormonszintjében tapasztalt különbségek szezonon belül és azon kívüli időszakban	93
4.3.5.2. A recipiens anyajuhok perifériás vérben mért hormonszintjében tapasztalt különbségek szezonon belül és azon kívüli időszakban	95
5. Az eredmények megbeszélése és az azokból levonható következtetések	98
5.1. Az embrió transzfer programok	98
5.2. A 2009. és 2010. áprilisi program anyagforgalmi paramétereinek vizsgálati eredményei I.- Donor anyajuhok (megbeszélés és következtetések)	100
5.3. A 2009. és 2010. áprilisi program anyagforgalmi paramétereinek vizsgálati eredményei II.- Donor anyajuhok (megbeszélés és következtetések)	102
5.4. A metabolikus hormonok vizsgálati eredményeinek elemzése	106
5.5. A vizsgált metabolitok és metabolikus hormonok lehetséges diagnosztikai és prognosztikai szerepe	112
6. Új tudományos eredmények	113
7. Az eredmények gyakorlati hasznosíthatósága	114
8. Összefoglalás	117
9. Summary	120
10. Irodalomjegyzék	123

11. Publikációs jegyzék	156
12. Ábrák jegyzéke	162
13. Táblázatok jegyzéke	165
14. Rövidítések jegyzéke	166
15. Köszönetnyilvánítás	168
16. Nyilatkozatok	169
17. Mellékletek	170

1. Bevezetés

1.1. Bevezetés

Az állati eredetű termékek iránt folyamatosan nő a kereslet, aminek a hátterében egyrészt a Föld lélekszámának gyors emelkedése, másrészt a fogyasztói szokások napjainkban is tartó átalakulása áll. Az előrejelzések szerint, az állati eredetű termékek iránt a jövőben is változatlanul fokozódik a fogyasztók érdeklődése. Az elmúlt évek tapasztalatai alapján az valószínűsíthető, hogy a termelés bővülése várhatóan nem az állatlétszám emelésével valósul meg, hanem a növekvő igények kielégítését inkább az állatok termék előállító-képességének a javításával biztosítják majd. Erre utal az egyik felmérés eredménye is, amely szerint a hús hasznú állatok termék előállító-képessége háromszor, míg a tejtermelő állatok által termelt tej mennyisége kétszer olyan gyorsan nőtt, mint amilyen ütemben emelkedett a termelésbe állított állatoknak a száma (CUNNINGHAM, 1996; GEROSA és SKOET, 2012).

Ugyanez a tendencia a juhágazatban is megfigyelhető. A juhtejből, valamint a kis faggyútartalmú juhhúsból készült, különleges minőségű termékek iránti a külföldi és a hazai fogyasztói érdeklődés egyaránt nőtt. A juh eredetű termékek kiválóan beilleszthetőek a mai, modern, tudatos, egészségközpontú fogyasztó étrendjébe, hiszen a juh napi táplálékfelvétele során kezeletlen ős/biogyepeken jár, számtalan gyógynövényt fogyaszt, amelyek hozzájárulnak a juhhús, és a juhtejből készült termékek egészséges táplálkozásban betöltött hatalmas szerepéhez a világ számos országában.

A világ vezető juhtenyésztő országaihoz képest jelentős lemaradásunk van az alkalmazott tartástechnológia, a juh eredetű termékek feldolgozása, kereskedelme, fogyasztása, valamint a szaporodásbiológiai-, és asszisztált reprodukciós technikák tenyésztésben való alkalmazása terén egyaránt. Következetes szakmai munkával és innovációval a lemaradásunk mindhárom területen behozható lenne. A modern, 21. századi állattenyésztés - még egy olyan, hagyományos tartási - tenyésztési rendszerrel rendelkező ágazatban, mint a juhtenyésztés - sem képzelhető el asszisztált reprodukciós módszerek és a biotechnológiai innovációk alkalmazása nélkül. DOHY (2000) szavaival élve: fel kell hívni a figyelmet arra, hogy a magyar állattenyésztés gyorsütemű, differenciált mennyiségi és minőségi fejlesztése nem tűr halasztást, és ez a

feladat-komplexum előtérbe állítja az asszisztált reprodukciós technikákat/technológiákat (ART) és a biotechnológiát, mint a fejlődés katalizátorait.

Az ART-k közül a juhtenyésztésben a legáltalánosabban, üzemi körülmények között is alkalmazható a mesterséges termékenyítés friss, hűtött és fagyasztott spermával, az embrióátültetés és a hozzá kapcsolódó eljárások, mint például a szuperovuláció, embriókinyerés, az embrió in vitro tenyésztése, embriófagyasztás, in vitro embrió előállítás (in vitro fertilizáció, lombik bébi program).

Az embrióátültetésre alapozott tenyésztési programok, mint például a Multiple Ovulation and Embryo Transfer (MOET) juh faj esetében is az alapját képezhetik más, bonyolultabb eljárásoknak. (A MOET program kifejezést 1983-ban alkotta NICHOLAS és SMITH, jelentése az embrióátültetés és a hozzá kapcsolódó technológiák összessége, melyek elősegítik a genetikai előrehaladást az állattenyésztésben). A MOET alkalmazása azonban a juh fajban ma még nem jellemző, inkább a szarvasmarhatenyésztésben találhatunk rá példákat.

Hasonlóan más fajhoz, sajnos a juhtenyésztésben is az embrióátültető program hatékonysága még mindig eléggé kiszámíthatatlan. Számos ismert és ma még ismeretlen tényező gyakorol hatást az embrióátültető program sikerére (hasznos embriók száma, embriók minősége, implantációs arány, az embrió transzfer sikere, stb.). Vizsgálati adatok szerint a juh fajban is befolyással van a program kimenetelére a donorok és a recipiensek fajtája, életkora, tartási és takarmányozási körülményei, kondíciója, az alkalmazott kezelési protokoll, évszak/szezon, beültetett embriók száma, stb. (CSEH és SOLTI, 2001; BARI és mtsai, 2002; GONZALES-BULNES, és mtsai, 2004). Az embrióátültető program eredményességét legnagyobb mértékben befolyásoló tényező a szuperovulációs hormonkezelésre kapott reakció (hasznos embriók száma). Sajnos ismereteink azonban nagyon elenyésző mértékben gyarapodtak a szuperovuláció mértékére/minőségére hatást gyakorló tényezőkkel kapcsolatban.

A dolgozatban bemutatott kísérlet sorozatban a következőkre kerestünk választ:

a donor és recipiens állatok periférás vérében a metabolikus hormonok szintjének (insulin-like growth factor 1 /IGF-1/, inzulin, trijód-tironon /T3/ és tiroxin /T4/), **és az energiaellátottságról tájékoztató bizonyos metabolitok** (béta-hidroxi-vajsav /BHB/, nem észterifikált zsírsavak /NEFA/, összfehérje /TP/, karbamid, koleszterol, aszpartát-

aminotranszferáz /AST/ GOT/) **perifériás vérben mért szintjének** milyen hatása van az embrióátültető program eredményességére.

Ezen összefüggések feltárásával jobban érthetőek lesznek az egyedek közti variabilitás okai, biztonságosabban és kiszámíthatóbban alkalmazható módszerré válik az embriókinyerés- és átültetés a juhtenyésztésben.

1.2. Célkitűzések

Az irodalmi áttekintésben részletesen tárgyalom a metabolikus paraméterek és hormonok kérdőzők szaporodásbiológiájára gyakorolt hatását, és a metabolikus hormonok és paraméterek perifériás vérben mért szintjének összefüggését az állatok tápanyagellátottságával. A juh embrióátültető programok (EÁ) eredményességét is nagymértékben határozza meg a donorok és a recipiensek takarmányozása. Egyetlen közlemény sem tárgyalja azonban az említett metabolikus paraméterek és hormonok perifériás vérben mért szintje és a juh EÁ programok eredményessége közötti összefüggéseket. Továbbá az a tény sem került még a tudományos vizsgálatok keresttüzébe, hogy a juh fajban akár sebészi, akár laparoszkópos mesterséges termékenyítést vagy embriókinyerést – és átültetést végzünk, elkerülhetetlen az állatok legalább 36 órás koplaltatása a beavatkozás előtt. Kérdés, hogy ez a rövidtávú metabolikus stressz hat-e és ha igen, hogyan a programok eredményességére?

A kísérletekkel kapcsolatos célkitűzéseinket a következő pontokban foglalom össze:

1. Célként tűztük ki, hogy két szezonon belüli és két szezonon kívüli EÁ programot hajtsunk végre magyar merinó fajtájú anyajuhokkal, üzemi körülmények között, melyekben vizsgáljuk:

(a) **donor** anyákban a szuperovulációs hormonkezelés hatására jelentkező *ovulációs válaszkészséget* (ovulációs ráta, a képződő sárgatestek száma, a kinyerhető és átültetésre alkalmas embriók száma és minősége)

(b) **recipiens** anyákban a ciklus szinkronizációját követően a képződő sárgatestek (CL) számát, az embrióátültetések eredményességét (az embrióátültetések utáni vemhesülések).

2. Meghatározzuk az **energiaellátottságról tájékoztató metabolitok** (béta-hidroxi-vajsav /BHB/, nem észterifikált zsírsavak /NEFA/, összfehérje /TP/, karbamid, koleszterol, aszpartát-aminotranszferáz /AST/ GOT/), **metabolikus hormonok** (insulin-like growth factor 1 /IGF-1/, inzulin, trijódtironon /T3/ és tiroxin /T4/), továbbá a sárgatest(ek) jelenlétéről, és a lutealis aktivitás mértékéről tájékoztató **progeszteron (P4)** perifériás vérben mért szintjét donor és recipiens anyajuhokban embrióátültető programok során.

3. Vizsgáljuk a metabolitok, metabolikus hormonok és a P4 kapcsolatát

(a) donor anyákban a szuperovulációs hormonkezelés hatására jelentkező *ovulációs válaszkészséggel* (amelyet az ovulációs rátával, a képződő sárgatestek számával és progeszteron /P4/-termelésével, valamint a kinyerhető embriók számával és minőségével jellemezhetünk);

(b) recipiens anyákban a ciklus szinkronizációját követően a képződő sárgatestek (CL) számával és P4-termelésével, továbbá az embrióátültetések eredményességével (ami a képződő sárgatestek száma és P4-termelése, valamint az embrióátültetések utáni vemhesülések révén mérhető).

4. A fent vázolt összefüggések feltárását tervezzük az *ősz*i (tenyésztidőszakban) és a *tavaszi* (tenyész-szeznonon kívüli) időszakban végrehajtott embrióátültető program során.

5. Arra a kérdésre is választ keresünk, hogy hogyan hat a sebészi embriókinyerés, illetve embrióbeültetés előtti kb. 36 órás takarmánymegvonás (metabolikus stressz) az állati szervezetre. Az erre adott metabolikus és endokrin válasz befolyásolja-e a kinyerhető embriók számát és minőségét (donor anyák), vagy az embrióátültetések sikerességét (recipiens anyák)?

6. Leírjuk a metabolitok és metabolikus hormonok diagnosztikai és/vagy prognosztikai jelentőségét.

2. Irodalmi áttekintés

2.1. Asszisztált reprodukciós technikák (ART)

A termékenyülés elősegítése céljából alkalmazott eljárások, mint például az ivarzás-szinkronizálás és az ivarzásindukció, a mesterséges termékenyítés (MT) és a spermamélyhűtés, az embrióátültetés és az embriómélyhűtés, továbbá az in vitro embrió előállítás (hétköznapi elnevezése lombikbébi program) és a legújabb, ma még inkább a humán gyakorlatban alkalmazott in vitro laboratóriumi embriológiai technikák (pl.: spermiuminjektálás, pre-implantációs genetikai diagnózis (PGD), asszisztált hatching, stb.) az ART-k csoportjába tartoznak. Az 1970-es, 80-as években az említett reprodukciós módszereket állattenyésztési biotechnikai eljárásoknak nevezték (biotechnológiai eljárásnak tekintették a módszert, ha a sejt belső állományát is érintette a beavatkozás, pl. génmódosítás, transzgenikus állat előállítása, stb.). Az 1990-es évektől kezdődően egyre gyakrabban lehetett - elsősorban a humán reprodukcióval foglalkozó tudományos cikkekben - az asszisztált reprodukció (AR), asszisztált reprodukciós technikák/eljárások/technológiák (ART) elnevezésekkel találkozni, amikor a szaporodás, termékenyülés/fertilizáció befolyásolására szolgáló eljárásokra történt utalás. A 90-es évek végétől az állatorvosi szakirodalom is átvette az AR és ART megjelöléseket és ma már inkább ezekkel találkozunk az állattenyésztési biotechnikai/biotechnológiai elnevezésekkel szemben.

Az ART-nak meghatározó szerepük van és lesz a jövőben is az állattenyésztés termelékenységének javításában. A korszerű ART segítségével, a csúcstermelésű ún. rekorder egyedektől, lényegesen több utódot nyerhetünk, mint természetes körülmények között ez remélhető lenne. A kiváló genetikai értéket képviselő, nagy termelésű szülőpároktól származó egyedek számának növelése révén, az állomány termelési mutatóiban - viszonylag rövid idő alatt - lényeges javulás érhető el.

Az AR azonban nemcsak ebben, hanem az intenzív állattenyésztés követelményeinek megfelelni már nem tudó, de a világörökség részét képező és ezért az utókor számára megóvandó őshonos állatok, valamint - hasonló okokból - a kihalással fenyegetett vadon élő ritka állatok megmentésében (szaporodás elősegítése, génbankok kialakítása fagyasztott spermából és/vagy embrióból) is kulcsszerepet tölthet be a jövőben (SOLTI és mtsai, 2000; CSEH és SOLTI, 2001). A különböző emlősfajok kihalása természetes

és visszafordíthatatlan folyamat, de napjainkra ez elképesztő méreteket öltött olyan emberi tevékenységeknek köszönhetően, mint pl.: az élőhely destrukció, vadászatok, és a harc a betelepített fajokkal (HOLT és PICKARD, 1999). A biotechnológia eredményeit és az asszisztált reprodukciós technikákat sikeresen alkalmazták számos háziállatfaj esetében, ugyanakkor ezen technológiák eredményessége a nem domesztikált fajok esetében vitatható (WILDT, 1992).

A háziállatok géntartalékai megőrzésének szükségességét a (HODGES, 1992; SZALAY, 2004) gazdasági-, tudományos-, kulturális-, és környezeti szempontok, valamint a biodiverzitás fenntartása támasztja alá.

A géntartalékok megőrzése szempontjából két alaptevékenységet különböztetünk meg: az **in situ** és az **ex situ** génmegőrzést. Az in situ génmegőrzés a tenyészállat populáció eredeti környezetében megvalósuló fenntartását célozza. Ex situ génmegőrzésnek tekintjük, amikor az eredeti környezetükből kiragadva az egyedeket, in vivo tartják fent a populációt. Ex situ megőrzésnek tekintjük azt is, amikor az állatok ivarsejtjeit (spermium, petesejt), vagy embrióit (esetenként egyéb sejtek, szövetek segítségével DNS állományát) in vitro mélyhűtve tartósan tárolják. A géntartalékok biztonságos, hosszú távú fenntartása érdekében az in situ és ex situ megőrzési módszerek párhuzamos alkalmazása javasolt (BREM és mtsai, 1989; BODÓ és SZALAY, 2007). A házi és vadon élő állatok géntartalékainak megőrzése és a biodiverzitás fenntartása azért is kötelességünk, mert egyes fajok kihalása a globális ökoszisztémát is veszélyeztetheti (MYERS és mtsai, 2000).

A modern, 21. századi állattenyésztés már nem képzelhető el az AR módszerek alkalmazása nélkül. A 21. század állattenyésztésén belül a juhtenyésztésnek is kitüntetett helye lesz a jövőben. A kiskérődzők évszázadok óta fontos közreműködői a világ élelmiszer és gyapjú előállításának. A Föld népességének folyamatos növekedésével párhuzamosan, a kiskérődző eredetű állati termék előállításnak egyre nagyobb szerep jut majd a jövőben, elsősorban a fejlődő, és a szélsőséges éghajlati adottságokkal rendelkező országokban (AMIRIDIS és CSEH, 2012).

Fel kell hívni a figyelmet arra, hogy a magyar állattenyésztés gyorsütemű, differenciált mennyiségi és minőségi fejlesztése nem tűr halasztást, és ez a feladatkomplexum előtérbe állítja a biotechnológiát, mint a fejlődés katalizátorát. Az új biotechnológia integrálása az állattenyésztésbe a következő területeken fokozódó jelentőségű (DOHY, 2000):

1. szelekciós nemesítés

2. transzgénikus egyedek hasznosítása
3. heterozisstenyésztés hatékonyságának növelése
4. „genetikai nyersanyagkincs” és a genetikai diverzitás megőrzése, növelése és kiaknázása
5. nemesítés nemzetközi integrációja.

Az asszisztált reprodukciós technikák alkalmazása Európa számos országában rutinszerűnek mondható a juhászatokban, amely megállapítás alól hazánk sajnos kivétel. A „nagy juhtenyésztő” országok, mint pl.: az Egyesült Királyság vagy Franciaország vezető tenyészeiben kis túlzással nap mint nap alkalmaznak valamilyen egyszerűbb vagy bonyolultabb asszisztált reprodukciós technikát. Az asszisztált reprodukciós technikák, úgymint a mesterséges termékenyítés (MT) vagy az embrióátültetés (EÁ, MOET) alkalmazásával legyőzhetőek a juh faj szaporodásbiológiai tulajdonságaiból adódó hátrányok, és gyorsítható a genetikai előrehaladás. Fontos megemlíteni továbbá, hogy a MOET-et költségei, és az anyajuhok szuperovulációs kezelésre adott, sokszor kiszámíthatatlan válaszreakciója miatt ma még nem lehet olyan széles körben és rutinszerűen alkalmazni, mint a mesterséges termékenyítést (COGNIE és mtsai, 2003). Az állat-biotechnológia szemléletét és eredményeit fokozatosan és folyamatosan kell beépíteni a hazai állattenyésztési stratégiába, a termelés, a feldolgozás, az állategészségügy és a környezetgazdálkodás szféráiba, alapvetően javítva agrárgazdaságunk pozícióit az éleződő nemzetközi versennyel szemben (DOHY, 2000). A biotechnológiát és az asszisztált reprodukciós technikákat egy „eszközökkel teli doboz”-nak tekinthetjük, amelyből az állattenyésztés szükségletei szerinti elemeket alkalmazunk (SMIDT és NIEMANN, 1999).

Annak ellenére, hogy számos ország mennyire rutinszerűen alkalmazza a fent tárgyalt technikákat, az alapeljárások között említett juh embrióátültetés eredményességét befolyásoló tényezők területén még számos kérdés megválaszolatlan tudományos körökben.

A juhtenyésztésben alkalmazott asszisztált reprodukciós technikák közül a mesterséges termékenyítést, az embrióátültetést és az embriómélyhűtést ismertetem, részletesen elemezve a kísérlet alapjául szolgáló területet, a juh embrióátültetés eredményességét befolyásoló tényezőket.

2.2. Mesterséges termékenyítés (MT)

A MT a gyakorlatba legkorábban bevezetett asszisztált reprodukciós technika, amikor speciális technikai eszközök segítségével juttatják a spermát (spermiumokat) a női nemi szervbe. Gyakorlati bevezetése mellett annak idején elsősorban állategészségügyi okok miatt döntöttek, azért, hogy megakadályozzák a nemi úton terjedő fertőző állatbetegségek terjedését. A II. Világháború után számos Közép-Kelet Európai országban (így hazánkban is) emelkedett a mesterségesen termékenyített anyajuhok száma a tervgazdaság és az állam részéről érkező "nyomás" következtében (KUKOVICS és mtsai, 2011). Ugyanakkor az állattenyésztők nagyon hamar felismerték, hogy a MT nem csak az állategészségügyet szolgálhatja, hanem az állatnemesítést is (genetikai előrehaladás felgyorsítása) (lásd később).

A MT-t a legkiterjedtebben a tejelő tehenészetekben alkalmazzák. Míg 1980-ban kb. 130 millió adag szarvasmarha termékenyítő anyagot használtak inszeminálásra az egész világon, addig 1998-ban már 260 millió dózist (BOLS és mtsai, 2010).

Juh fajban a MT-t legkiterjedtebben Dél-Amerikában és Ausztrál-Ázsiában alkalmazzák, Európában pedig Franciaországban, Angliában és Írországban (SZABADOS és mtsai, 2005; DYRMUNDSSON, 2007). Hazánkban a mesterségesen termékenyített anyajuhok száma az 1960-as években érte el a csúcát, amikor is az állomány 63%-át inszeminálták. Hajdú-Bihar megyében ez az arány 85% volt az 1970-es évek közepén (KUKOVICS és mtsai, 2011). Manapság sajnos a termékenyített anyajuhok arányát csak kb. 2% alattira becsülik (KUKOVICS és mtsai, 2011). 2003-tól a mesterséges termékenyítés állami támogatását is megszüntették, éppen akkor, amikor nagy szükség lenne az ágazat jövedelmezőképességének javítására, a minőségi végtermék előállítás színvonalának emelésére (SZABADOS és mtsai, 2005). JÁVOR és mtsai (2003) szerint a mesterséges termékenyítés jelenlegi mértéke Magyarországon nem alkalmas sem a kis létszámú fajták arányának növelésére, sem a genetikai előrehaladás gyorsítására.

2.2.1. A MT előnyei és hátrányai

A juh MT-el, a kossperma tartós tárolásának az előnyeivel és a gyakorlatban alkalmazott termékenyítési technikákkal több tanulmány foglalkozik részletesen

(EVANS és MAXWELL, 1987; SALAMON és MAXWELL, 2000; PARKINSON, 2009).

A MT-nek több előnye is van: a pázás útján terjedő betegségek megakadályozása, ahogy arra már történt utalás korábban, továbbá egy tenyészkostól lényegesen több utód nyerhető élete folyamán, szemben a természetes pároztatással (ezért erős szelekciós nyomás valósítható meg az apai oldalról). Az utódállomány sokkal egyöntetűbb és hatékonyabb tenyésztői munka valósítható meg (a genetikai előrehaladás felgyorsítható), valamint az időközben elpusztult tenyészkosok mélyhűtött spermáját is fel lehet még használni MT-re és utódokat nyerhetünk tőlük.

Hátrányok: nagyobb az eszköz és munkaerő igénye a természetes pároztatásénál, ivarzás megfigyelést kell alkalmazni, ami lelkiismeretes és pontos munkát, továbbá időt és türelmet igényel, képzett szakemberre van szükség. Mindezek mellett CSEH és mtsai (2012) felhívják a figyelmet arra, hogy a mesterséges termékenyítéshez használt sperma (fertőzött donor, kontamináció a spermavétel közben) fertőzések forrása is lehet.

2.2.2. A kossperma gyűjtése, értékelése és feldolgozása

A sperma gyűjtése történhet műhüvellyel vagy elektroejakulációval. Az utóbbi módszernél gyakran fordul elő, hogy tartós tárolásra (fagyasztásra) alkalmatlan minőségű (csökkent életképességű spermiumok) és kis mennyiségű ondót sikerül gyűjteni (NUTI, 2007). A spermagyűjtést követően az ejakulátum mennyiségi és minőségi paramétereit ellenőrizni kell: koncentráció (normál tartomány: 3,5-6,0 milliárd/ml), motilitás/mozgékonyosság (tömeg mozgás és a spermiumok progresszív egyedi mozgása; normálisan a sejtek 80-90%-a mozog) és morfológia (a spermiumok 70-80%-ának szabályos morfológiával kell rendelkeznie). A minőség minél pontosabb értékelésére egyéb laboratóriumi tesztek is igénybe vehetünk (NUTI, 2007; WHO, 2010; FAIGL és mtsai, 2012).

Az 1960-as években a glükóz-citrát-tojássárgája alapú hígítók mellett legáltalánosabban a tehéntejet használták a kossperma hígítására (EVANS és MAXWELL, 1987). Napjainkban inkább a Tris-alapú hígítókat részesítik előnyben (Tris-glükóz-tojássárgája, vagy Tris-citrát-fruktóz-tojássárgája) (SALAMON és MAXWELL, 2000; SHIPLEY és mtsai, 2007). Tej használatakor ügyelni kell arra, hogy hőkezelt legyen (pasztörizált tej; a tejben lévő laktenin fehérje spermicid, ezért azt semlegesíteni kell). A hígítást követően lassan kell 5°C-ra hűteni a spermát. Az alacsony hőmérsékleten történő tárolásnak a lényege az, hogy csökkentsük a

spermiumok metabolikus aktivitását, amivel az in vitro körülmények közötti túlélésük idejét tudjuk növelni. Javasolt a hígított spermát a gyűjtést követő 8 órán (max. 12-24 óra) belül felhasználni MT-re, ugyanis ezután a spermiumok fertilitása viszonylag gyors ütemben csökken. A tapasztalatok szerint az első 24 óra után naponta 10-35%-al csökken a tárolt sperma termékenyítőképessége (MAXWELL és WATSON, 1996; SALAMON és MAXWELL, 2000). A csökkenő fertilitás háttérében a sejtek motilitásának, valamint a normális morfológiával bíró spermiumok számának a csökkenése húzódik meg. A folyékony tárolás siettetheti a spermium membránjának az érési folyamatait, amelynek következtében a kapacitáción és az akroszóma reakción túljutott spermiumok (túlérett spermiumok, „túlkoros” spermiumok) aránya ugrásszerűen megemelkedhet a mintában, ami viszont az élettartam és a termékenyítőképesség csökkenéséhez vezet. Ezt a jelenséget feltételezik a hosszabb ideig 5°C-on tárolt folyékony spermával végzett termékenyítések után megfigyelt korai embriófejlődési zavarok (embrió felszívódás) háttérében (PARKINSON, 2009).

A folyékony nitrogén hőmérsékletén (-196°C) fagyasztott állapotban történő tárolásnak igen nagy előnye, hogy a spermiumokat gyakorlatilag korlátlan ideig tudjuk eltartani. SALAMON és mtsai (2004) 35 évig fagyasztva tárolt spermiumokkal termékenyítettek intrauterin anyajuhokat és a mai elvárásoknak megfelelő termékenyülési arányt értek el, bizonyítva, hogy -196°C-on a hímivarsejtek több évtizedig képesek megőrizni termékenyítőképességüket. Fagyasztott spermával történt termékenyítéskor GERGÁTZ és GYÖKÉR (1997) 38-46%-os termékenyülési arányról számolt be. A folyékony nitrogén hőmérsékletén a spermiumok anyagsere folyamatai teljesen megállnak, ugyanakkor bármikor mozgósítani tudjuk a sejteket, amelyek többsége visszanyeri mozgás- és termékenyítőképességét. Mindezek ellenére a fagyasztás és felolvasztás folyamata a kos spermiumok sérülését idézheti elő. Adatok támasztják alá azt a megfigyelést, miszerint a felolvasztás a spermiumok korai kapacitációját idézheti elő, valamint a sejtek élettartamát rövidítheti (GILLAN és MAXWELL, 1998; SALAMON és MAXWELL, 2000). Csökkenhet a mozgó spermiumok aránya, és a rendellenes mozgásformát mutató sejtek aránya is emelkedhet a spermium fark részét alkotó elemek károsodása következtében (WATSON, 1995). A középső részben található mitokondriumok is sérülést szenvedhetnek a fagyasztás következtében, ami az energiatermelés zavarát és az előállított energia mennyiségét csökkentheti és mindezek következtében a mozgás/mozgékonyosság is zavart szenvedhet (GILLAN és mtsai, 2004). Elképzelhető, hogy a mozgáshoz rendelkezésre álló

energiamennyiség csökkenése az oka annak, hogy fagyasztott spermával végzett intracervikális és/vagy vaginális termékenyítést követően lényegesen alacsonyabb termékenyülési arány érhető el, szemben az intrauterin technikával.

A juh nyakcsatornájának különleges anatómiája miatt igen kis mennyiségű termékenyítő anyag szükséges a MT-hez (<0,25 ml), amiben igen nagy számban található spermium (nagy a spermiumok koncentrációja), hogy elkerüljük a sperma visszafolyását. Hüvelyi termékenyítésnél 400×10^6 spermium/ml, cervikális inszeminálásnál 200×10^6 spermium/ml a spermiumok koncentrációja. Ennek az a következménye, hogy 1:1 és 1:4 hígítást lehet csak alkalmazni, ami nem biztosít megfelelő védelmet a spermiumok számára (alacsony a védőanyag koncentráció a spermiumok nagy számához képest). Laparoszkiás intrauterin MT-nél csak 20×10^6 spermiumra (/ml) van szükség (CSEH és mtsai, 2012).

A fagyasztáshoz az optimális glicerín koncentráció 4-6% (SALAMON és MAXWELL, 2000). A glicerint 1-2 lépésben adják a spermiumokhoz (30°C -on vagy 5°C -on), majd kb. 1,5-2 órán keresztül hűtik 5°C -ra. Ezután a spermát pellet (0,1-0,2 ml) formájában szárazjégen (-60°C) vagy műszalmában, programozott fagyasztó berendezésben (hűtési sebesség: $-8^\circ\text{C}/\text{perc}$) vagy folyékony nitrogén gőzében (10 perc, 4-6 cm-rel a folyékony nitrogén szintje felett tartva, ahol a hőmérséklet kb. -75°C és -125°C között van) tartva lehűtik kb. -80°C - 120°C -ra. Erről a hőmérsékletről közvetlenül kerülnek a folyékony nitrogénbe. A műszalma esetében a felmelegítést 35 - 40°C -os vízben végzik (30 másodperc), míg a pelletet előmelegített speciális felolvasztó oldatban (hígítóban) melegítik fel.

2.2.3. Termékenyítési technikák a juhtenyésztésben

A juhtenyésztésben a következő termékenyítési technikákat alkalmazzák a gyakorlatban: 1) vaginális (hüvelyi), 2) külső méhszáji, cervikális (nyakcsatornai), 3) cervico-uterinális (transzcervikális) és 4) intrauterin (méhbeli) termékenyítés.

A laparoszkiós mesterséges termékenyítés a legeredményesebb, ugyanakkor a legdrágább és legbonyolultabb módszer is egyben (KUKOVICS, 2011). Az 1980-as években Új-Zélandon az elsők között alkalmazták az intrauterin laparoszkiás termékenyítést, amikor mindkét méhszarv lumenébe kb. 0,03-0,04 ml spermát juttattak.

Az ellési arány friss sperma esetén 83%, míg a fagyasztott spermánál 38% volt (TERVIT és mtsai, 1984). Más szerzők fagyasztott spermával 40-60%-os ellési arányt értek el (KILLEEN és mtsai, 1982).

Hazánkban először 1987-ben alkalmazták a laparoszkópos MT-t mélyhűtött spermával és éves jerekénél 53%, míg anyajuhokban 71%-os fogamzási arányról számoltak be (MAGYAR és mtsai, 1989). Sikerült egy egészen új, laparoszkópos termékenyítésnél eredményesen alkalmazható pipettát is kifejleszteni (MAGYAR, 1994).

Napjainkban a világ számos országában rutinszerűen, üzemi körülmények között alkalmazzák a laparoszkópos termékenyítést, 70-85% közötti fogamzási aránnyal. Az eredmény természetesen nagymértékben függ a spermaminőségétől, a fajtától, a kóstól, a szezontól és az inszeminálást végző szakember gyakorlottságától (www.toprams.com).

A legegyszerűbb és legkevésbé hatékony termékenyítési módszer a vaginális. A cervikális, cervico-uterinális és transzcervikális módszerek "átmenetet" képeznek a laparoszkópos MT-hez, és az általuk elérhető termékenyülési % a penetráció mélységétől függ (KUKOVICS, 2011).

A juh méhnyakcsatornáját (cervix), annak anatómiai felépítése miatt, sokáig „átjárhatatlannak” tartották a transzcervikális katéterek számára. Az utóbbi pár évtizedben azonban több kutatócsoport is behatóan foglalkozott a juh nyakcsatornájával, és olyan inszemináló katéter kifejlesztésével, amivel lehetségessé válik, az ún. nyakcsatornai (cervikális), vagy ún. mély nyakcsatornai (cervico-uterinális/transzcervikális) termékenyítés.

A transzcervikális MT és oxytocin adagolás illetve a laparoszkópos MT eredményességét összehasonlítva, mindkét kísérleti elrendezésben a laparoszkópos MT-sel értek el magasabb vemhesülési arányt (SAYRE és LEWIS, 1997). Embrióátültetésre előkészített, szuperovuláltatott anyajuhokon tehát a laparoszkópos MT ajánlott a transzcervikális termékenyítéssel szemben (HOSSEINI- PAJOH és mtsai, 2005).

Egy amerikai kutatócsoport által kifejlesztett juh cervikális katéterrel ugyanolyan fogamzási eredményeket értek el, mint az uterinális laparoszkópos termékenyítéssel (WULSTER- REDCLIFFE és LEWIS, 2002).

Azt, hogy az inszemináló katétert milyen mélyre lehet bevezetni a jereké, egyszer, illetve többször ellett anyajuhok esetében számos tényező befolyásolhatja, mint például

az állat életkora, a ciklusstádium, valamint a külső méhszáj morfológiája (KERSHAW és mtsai, 2005).

Az anyajuhok életkorának növekedésével a méhnyak hossza és szélessége nő, míg a ráncok mennyisége csökken, ami a katéter könnyebb felvezethetőségét teszi lehetővé (KAABI és mtsai, 2006; SZABADOS, 2006). A katéterek közül a hajlított változat jobb fogamzási eredményeket adott, mint az egyenes (KAABI és mtsai, 2006). Egy kanadai kutatócsoport fagyasztott spermával végzett, transzcervikális nem sebészi mesterséges termékenyítésről közölt tanulmányt (BUCKRELL és mtsai, 1994). Az általuk kifejlesztett transzcervikális technikával 2060 anyajuh közül 1809 nyakcsatornája volt teljesen átjárható (amely anyajuhokat termékenyítették is fagyasztott spermával). A penetráció sikere a kezdeti 76,3%-ról az utolsó 500 termékenyítés esetében már 97,9%-ra emelkedett. A bárányozási % átlagosan 32,5% volt, de nagyban befolyásolta az eredményeket a szezon, és a kísérleti év is. Ez a kutatócsoport is megállapította, hogy azoknál az állatoknál, amelyek már ellettek, illetve azoknál, amelyek utolsó ellése után nem telt még el 4 hónap, sokkal könnyebben volt felvezethető a termékenyítő katéter a nyakcsatornán keresztül. Ez azt jelenti, hogy a kifejlesztett transzcervikális technika elsősorban azokon a farmokon alkalmazható könnyen és gazdaságosan, ahol sűrítve elletnek. A fenti összefüggéseket SZABADOS (2006) is leírta, kiegészítve azzal, hogy a külső méhszáj alakulása (rozetta, kacsacsőr, vitorla, spirális) és a katéter felvezethetősége között összefüggés van.

A hazai gyakorlatban általánosan használt a módosított Milovanov-féle (TASI és mtsai, 1980; GERGÁTZ és GYÖKÉR, 1997; SZABADOS és mtsai, 2005) cervico-uterinális katéter. A szélesebb csavarulatú katéter anyajuhok, a keskenyebb jerekék inszeminálására használható. Az eljárással 69,6-76,4%-os termékenyülési arány érhető el (SZABADOS, 2006).

Megállapíthatjuk tehát, hogy számos tényező befolyásolhatja a MT eredményességét, mint például: tartás és takarmányozás, az állat életkora, szezon, a termékenyítést végző személy gyakorlata, és az alkalmazott inszeminálási technika (ANEL és mtsai, 2005; KUKOVICS, 2011). Mindezek mellett az ivarzás szinkronizálást követő inszeminálás pontos időzítése (FERNANDEZ-ABELLA és mtsai, 2003; KARAGIANNIDIS és mtsai, 2001; DONOVAN és mtsai, 2001 és 2004; KUKOVICS, 2011) 46.; 48. és 72.; valamint 58. és 63. órában- , és az alkalmazott Pregnant Mare Serum Gonadotrophin (PMSG) mennyisége (HILL és mtsai, 1998) is

hatással van a mesterséges termékenyítés eredményességére (300 NE alkalmazása a legjobb, 79,1%-os fogamzási arányt hozott).

Ivarzás szinkronizálás után, a mesterséges termékenyítésre kijelölt anyajuhok közé ivarérett kost helyezve, befolyásolhatjuk 1. a luteinizáló hormon (LH) csúcs időpontját; 2. az ovulációt mutató egyedek számát; 3. a vemhességi rátát, és így összességében a szaporodásbiológiai paramétereket és a mesterséges termékenyítés eredményességét (LUCIDI és mtsai, 2001).

Ma már jól ismert, hogy azoknál a tenyésztőknél javasolt az ART (MT) alkalmazása, akiknél a tartási és takarmányozási, valamint állategészségügyi feltételek megfelelőek. Az új reprodukciós technikák használata csak ilyen tenyészetekben/állományokban fog hozzájárulni a bevételek emeléséhez (VÉGH és mtsai, 2007). Fagyasztott sperma használatakor elsősorban az intrauterin laparoszópos termékenyítés jöhet szóba (a transzcervikális módszer a biztató eredmények ellenére sem kellően kidolgozott még), melynek eredményessége még napjainkban is jóval elmarad a kívánatostól (HARESIGN, 1992; GERGÁTZ és GYÖKÉR, 1997).

2.3. Embrióátültetés (EÁ)

Az embrióátültetés (EÁ), a mesterséges termékenyítés után a második legnagyobb jelentőséggel bíró AR-os eljárás, amit világszerte széles körben alkalmaznak. SEREGI említi 1997-ben, hogy „az eljárás a nőivarban olyan fejlődést eredményezhet, mint amelyet a MT a hímivarban”.

A Nemzetközi Embrió Átültető Szövetség (IETS) által közzétett adatok szerint az utóbbi időben csökkent a beültetett juh embriók száma. A korábbi 25-30 ezerrel szemben az elmúlt években kb. 15 ezer beültetést végeztek az egész világon (IETS, 2010). A jövőt tekintve nagyon biztató, hogy az IETS által 2011-ben megjelentetett adatok szerint - ami a 2010-es állapotokat tükrözi - ismét elkezdett emelkedni a beültetett juh embriók száma (IETS, 2011).

Az EÁ előnyei között CSEH és DOHY a következőket említi 2003-ban:

1. A genetikai előrehaladás gyorsítása azáltal, hogy a nagy tenyészértékű nőivarú egyedektől lényegesen nagyobb számú utód nyerhető életteljesítményük alatt (4 vs. 20-25), szemben a természetes pároztatással vagy a MT-el, továbbá a

módszer alkalmazásával nemcsak az apai oldal felől vagyunk képesek szelekciós nyomást gyakorolni, hanem az anyai oldal felől is.

2. A tenyésztési szempontból értékes nőivarú állatok nagyobb mértékben képesek hozzájárulni a genetikai előrehaladáshoz, mint a MT esetében.
3. Az embrió formájában történő tenyészállat kereskedelem révén biztonságosabbá vált a tenyészállat forgalmazás, hiszen nincs szállítási veszteség és az állategészségügyi kockázat lényegesen csökkenthető, továbbá nem jelentkeznek akklimatizációs problémák.
4. Megkönnyíti és gazdaságosabbá teszi a nemzetközi tenyészállat kereskedelmet.
5. A ritka, kívánatos, továbbá a piac által igényelt genetikai tulajdonságokkal rendelkező típus/állomány gyorsabban elszaporítható. Embrió formájában sokszor sikerül olyan génállományt is megszerezni, ami egyéb módon (élőállatok vásárlása) nem lenne elérhető.

2.3.1. Génmegőrzés

Az embrióátültetés a veszélyeztetett állatfajok esetében is segíthet a populációk fenntartásában, habár a kezdeti sikerek ellenére nem vált annyira rutin eljárássá, mint a mesterséges termékenyítés. A génmegőrzésben elsősorban a fajok közötti embrióátültetésnek lenne létjogosultsága, azonban ez a terület még kevésbé tanulmányozott (ANDRABI és MAXWELL, 2007). A veszélyeztetett kiskérődzők embrióátültetéseiről néhány tudományos eredmény: örmény vörös juh embrió átültetése házi juhba (COONROD és mtsai, 1994), spanyol ibex embrió átültetése házi kecskébe (FERNANDEZ-ARIAS és mtsai, 1999). Fajok közötti sikeres embrióátültetésről pedig a következő két közlemény született: európai muflon embriók átültetése házi juhba (MORENO és mtsai, 2001; PTAK és mtsai, 2002), és urial (*Ovis vignei*) embriók átültetése házi juhba (ULLAH és mtsai, 2006).

2.3.2. A juh EÁ története, a nemzetközi helyzet és a hazai eredmények

Az első sikeres juh EÁ-ról 1934-ben közöltek adatokat tudományos cikk formájában (WARWICK és mtsai, 1934). Az első sikert hamarosan további eredmények követték (LOPYRIN és mtsai, 1950; 1951; HUNTER és mtsai, 1955; KARDYMOWITZ és STEPINSKI, 1957).

Ezeknél az első próbálkozásoknál a ma is alkalmazott sebészi embrióátültetési technika alapjait fektették le (medián laparatómia). Az azóta eltelt időben számos újabb

eredmény látott napvilágot a témában, a juh és a kecske EÁ-ról is (ARMSTRONG és EVANS, 1983; NUTI és mtsai, 1987; WALKER és mtsai, 1989; BARRY és mtsai, 1990; PENDELTON és mtsai, 1992; SENN és RICHARDSON, 1992).

Az első sikeres hazai juhembrió-átültetést HARASZTY ÉS RÓNAY (1977) végezték.

Hazánkban az üllői kísérleti Intézetben (korábban OTÁF, illetve BIOTECH üllői Embrióátültető Állomása) 1982-ben kezdték meg az embrióátültető munkát juh fajban. A több, mint évtizedes munka célja az volt, hogy az adaptált ausztrál juhembrió-átültetési technológiát egyszerűsítve, továbbfejlesztve olyan komplex eljárást alakítsanak ki, amely nemcsak laboratóriumi, hanem gyakorlati körülmények között is jól működik. Olyan laparoszkópos termékenyítési, és komplex juhembrió-átültetési technológiát dolgoztak ki, amely beilleszthető a gyakorlati juhtenyésztés sajátos, megszokott munkarendjébe, de az eljárás eredményessége sem csökken. Az évtizedes eredményeket összefoglalva kijelentették, hogy a programot kellő körültekintéssel megszervezve és végrehajtva megfelelő, a gazdaságosságot biztosító hatékonysággal lehet végezni „farm” körülmények között is. A kutatócsoport 1982 és 1990 között összesen 2033 juhembriót „mozgatott meg” (CSEH és mtsai, 1994).

1984-ben GERGÁTZ és mtsai biotechnikai eljárást dolgoztak ki bakteriális fertőző betegséggel terhelt import tej-húshasznú lacaune juhállomány genetikai anyagának megmentésére embrióátültetéssel. Az állomány a tej és hústermelés szempontjából rendkívül nagy genetikai értéket képviselt, ezért a generációváltásos mentesítést - az egyetlen igazán biztonságosnak látszó módszerrel - embrióátültetéssel végezték el. A 4 évig tartó mentesítés folyamán a recipiens anyáktól született egészséges utódok képezték a bázisát az új kettőshasznú (tej-hús) genotípusnak (http://users.atw.hu/pharmagenefarm/tortenet_gazd_adatai.htm).

1986-ban közlemény jelent meg identikus ikerbárányok előállításáról embriódarabolással, majd egy kecske-juh fajok közötti chimerautód világra jöttéről, amely kutatásokat a mosonmagyaróvári biotechnikai állomáson végezték (GYULAI és PETHES, 1986).

1994-ben HOLDAS és mtsai vizsgálataikban olyan juh embrióátültetési, - manipulációstechnikát kívántak kidolgozni, amely minimális laboratóriumi munkát igényel, üzemi gyakorlatban, akár kiskisgazdaságokban is alkalmazható. Összesen 474

állatot kezeltek (133 donor, 341 recipiens), és 258 anyát műtöttek (132 donor, 126 recipiens), 85 recipiens pedig felezett embriót kapott. Donorok esetében az a szuperovulációs és ovulációsinkronizációs módszer bizonyult a legeredményesebbnek, amelyben 1000 NE PMSG-t az implantátum kivétele előtt 24 órával adtak intramuszkulárisan (i.m.), és amit a kivétel után 36 órával 1000 NE human Chorionic Gonadotropin (hCG) intravénás (i.v.) injekció követ. A legjobb embriókinyerési eredményeket a vemhesség 6. napján kapták, embriófelezésre pedig a blastocysta-kikelt blastocysta stádiumot tartották legmegfelelőbbnek.

1995-ben juhembriók petesejtekből, In Vitro Matured, Fertilized and Cultured (IVMFC)- eljárással történő előállításáról és sikeres beültetéséről jelent meg közlemény hazánkban elsőként (CSEH és mtsai, 1995).

Az elmúlt években (2009, 2010 és 2011-es adatok) a juh embrióátültető tevékenység hazánkban a következőképpen alakult: csaknem több évtizedes szünet után ismét folyt (említésre méltó) biotechnikai tevékenység a juhtenyésztésben: Mikepércsen, egy Nemzeti Kutatási és Technológiai Hivatal (NKTH) projekt keretein belül ("A piaci igényeknek és az éghajlatnak megfelelő juhok tenyésztése és nemesítése") egyrészt 18 donor nőivarú juhtól 130 átültethető embriót nyertek, amelyet friss állapotban azonnal be is ültettek. 300 mélyhűtött dorper juhembrió importjára is sor került, amelyeket már szintén beültettek recipiensekbe. A Szent István Egyetem (SZIE) Állatorvos-Tudományi Kar Andrológiai Laboratóriuma juhembrió átültető állomásként elfogadást nyert, a juh fajban ők végezték a fenti tevékenységet, Prof. Dr. Cseh Sándor vezetésével Dr. Vass Nóra és Dr. Faigl Vera alkották a munkacsoportot.

A szarvasmarhához viszonyítva az egyéb fajoknál az embrióátültetési tevékenység a kontinens más országaiban is csekély: juhoknál Európa szerte 446 embriót (ebből Magyarország 278-at) ültettek be és 273 embriót mostak ki donor anyajuhokból, sertésnél és kecskénél az adatközlés nemleges, lovaknál 289 embriót állítottak elő, és 123-at ültettek be. (Hazánkon kívül csupán Csehország, Olaszország és Portugália jelentett még ló embrió transzfert.) (FLINK, 2010.)

2.3.3. A juh EÁ programokban szereplő donor és recipiens állatok előkészítése

Évtizedek óta ismert, hogy a donor és recipiens állatok tartása és takarmányozása alapvetően határozza meg az EÁ programok sikerességét. Mivel a

juhok nehezen kezelik az átcsoportosításból eredő stresszt, a donor és recipiens állatokat már legalább 2 hónappal a tervezett programok előtt célszerű külön tartani és takarmányozni a többiektől, különös gondot fordítva az állategészségügyi ellátásra (vakcinázások, féreghajtás, stb.) is (ISHWAR és MEMON, 1996). Az aszezonális juh és kecskefajtáktól egész évben (CHEMINEAU és mtsai, 1986), míg a szezonálisoktól elsősorban a tenyészszezon alatt gyűjthetők nagy számú, jó minőségű embriók (SENN és RICHARDSON, 1992).

2.3.4. Ivarzásszinkronizáció és szuperovuláció

Nemzetközi és hazai viszonylatban egyaránt fontos hangsúlyozni, hogy az embrióátültetés talán legfontosabb hátránya rendkívüli költség igénye (drága hormonkészítményeket kell használni a szuperovulációnál, recipiens állatok tartási/takarmányozási költsége, szakemberek munkabére, stb.). Ez a jelenlegi gazdasági viszonyok között különösen hátráltatja a módszer alkalmazását és terjedését a hazai üzemekben.

A donor és recipiens állatok szinkronizációja ma is a SHELTON és MOORE (1966) által leírt módon, progesztagén tartalmú hüvelyszivacs, és PMSG egyidejű alkalmazásával történik. A tenyészidényben megfelelő a 10-14 napos gesztagénkezelés gonadotrop adásával kombinálva az ivarzásszinkronizációhoz. Tenyészidényen kívül folliculusfejlődést stimuláló hormon (FSH)-kezeléssel lehet ciklust indukálni. A biotechnikai módszerek mellett zootechnikai eszközökkel is irányítható az ivari működés: a flushing és a fényprogram jöhet számításba, ezekre azonban nem alapozható a bárányozási terv. A biotechnikai módszerek eredményességét viszont jelentősen emelik az egyidőben alkalmazott zootechnikai módszerek (BECZE, 1987).

LÁTITS (1987) 1980-as években végzett vizsgálataiban egy "natúr" progeszteron hatóanyagú, Sil-estrus implantátum, vagy a Chrono-gest hüvelytampon használata bizonyult a legeredményesebbnek merinó juhok esetében ciklusindukció kiváltása céljából. BECZE és mtsai (1971) ösztradiol-valerát és tesztoszteron-önantátot tartalmazó injekció alkalmazásával értek el 100%-os ivarzási arányt egy fésűs merinó állományban.

A ma alkalmazott progeszteron analóg az ún. flugeszton-acetát, amely közel 20-szor hatékonyabb, mint a progeszteron. A progeszteron-receptorokhoz való kötődése révén a flugeszton-acetát negatív feed-back hatást gyakorol a hipotalamo-hipofízis rendszerre, elnyomja a gonadotropin felszabadulást, ezáltal a folliculus növekedést és az ovulációt.

A szivacs 12-14 napos alkalmazását követő eltávolítás után a negatív feed-back megszűnik, és a hirtelen gonadotropin felszabadulást tüszőnövekedés és ovuláció követi.

A juh EÁ „gyenge láncszeme” a szuperovuláció. Még mindig a 70-es években kialakított szuperovulációs eljárást használjuk. A szuperovulációt a tehenekben alkalmazott módon, FSH kezeléssel végzik 12 óránként injekciózva, a gyakorlatban kb. 4 nappal a szinkronizációs kezelés vége előtt elkezdve. Nem jártak sikerrel azok a próbálkozások, amelyek az FSH injekciók gyakoriságának csökkentésére törekedtek. Az FSH és a PMSG kezelést összehasonlítva, az FSH kezelés nagyobb számú, de kisebb méretű preovulációs tüszőt, és nagyobb számú jó minőségű embriót eredményezett (ARMSTRONG és EVANS, 1983). Az eqine chorionic gonadotrophin (eCG) kombinációja FSH-val javította az anyajuhok szuperovulációs válaszreakcióját (CSEH és SOLTI, 2001).

Ezen a téren előrelépésként talán annyit könnyvelhetünk el, hogy a hormonkészítmények tisztasága nagymértékben javult, ugyanakkor a hatékonyság lényeges javulásában ez nem mutatkozik. A szuperovuláltatott állatok 30%-a nem reagál a kezelésre, 30%-a gyengén reagál (1-4 embrió), 30%-a jó reakciót mutat (5-10 embrió), és csak 10%-a reagál rekord embriótermeléssel. (CSEH és DOHY, 2003). Szuperovulációs kezelést követően a donoronkénti átlagos CL számot egyes szerzők 5-15-ben állapítják meg (HILD-PETITO és mtsai, 1987; JABLONKA-SHARIFF és mtsai, 1993; GONZALES-BULNES és mtsai, 2004), míg WINDORSKI és mtsai (2007) vizsgálatai alapján ez az érték 5-52 sárgatest között változik anyajuhonként.

A szuperovulációs hormonkezelésre kapott petefészek válasz minősége megjósolhatatlan és teljesen kiszámíthatatlan, mivel számos belső (fajta, a petefészken található follikulusok állapota, stb.) és külső (hormonkezelés, takarmányozás, szezon/évszak, alkalmazott gonadotrop hormon és annak tisztasága) tényező befolyásolhatja.

A szuperovuláció előidézésének módszerei

Az eCG

Az 1960-as évektől kezdődően alkalmazzák az **eCG (PMSG)-t** szuperovulációra önmagában vagy FSH-val együtt (CSEH és SOLTI, 2001). Az eCG-s szuperovulációs programok eredményessége (hasznos embriószám) nem éri el az FSH-s programokét.

Gondot okozhat az eCG alkalmazásakor az ellenanyag produkció is, ami még alacsony dózis esetében is jelentkezik és megakadályozhatja a donor eredményes felhasználását későbbi programokban (BODIN és mtsai, 1997).

FSH

Az elmondottak következtében az eCG helyett már évtizedek óta az FSH-t tartalmazó készítményeket alkalmazzák a gyakorlatban (ARMSTRONG és EVANS, 1983). Szemben az eCG-vel, az FSH-nak nagyon rövid a felezési ideje, ezért naponta kétszer kell adni (12 órás időeltéréssel; emelkedő vagy csökkenő koncentrációban), ezért az FSH-s programok munkaigényesebbek és nagyobb költséggel járnak, de a hasznos embriószám magasabb (CSEH és SOLTI, 2001; ARMSTRONG és EVANS, 1983). Az FSH tartalmú készítmények sertés, juh és szarvasmarha hipofízisből kivont FSH-t tartalmaznak és fajtól illetve termelési számtól függően eltérő mértékben lehetnek „szennyezettek” luteinizáló hormonnal (LH), ami nagymértékben befolyásolhatja a szuperovulációs kezelés eredményét (follikulusok száma, termékenyülési arány, hasznos embriók száma és embrióminőség) (D’ALESSANDRO és mtsai, 2005; TAFT és mtsai, 1996). Egyre gyakrabban merül fel élelmiszer-biztonsági okokból aggály a hipofízis eredetű FSH alkalmazásával kapcsolatban, hiszen ezek a készítmények esetleg tartalmazhatnak vírusokat, prionokat és/vagy baktériumokat (GALLI és mtsai, 2003). Ezekre az aggodalmakra megoldást jelenthet a jövőben a rekombináns technikával előállított FSH, bár a szerzők e tekintetben szkeptikusak, hiszen ezek a készítmények, amelyeket a humán asszisztált reprodukcióban már évek óta alkalmaznak nagyon drágák.

Progesztagén, PGF2alfa és eCG

Az elmúlt években biztató eredményeket értek el egy új szuperovulációs módszerrel, amikor a donor rövid ideig hüvelyszivacsos progesztagén kezelésben részesül, majd a szivacs eltávolításakor prostaglandin F2alfa (PGF2 alfa) és eCG kezelést alkalmaznak, amit 36 órával később Gonadotrop Releasing Hormon (GnRH) analóg kezelés követ (ovuláció indukció). A szuperovulációs kezelés (6-8 csökkenő dózisú FSH injekció, amit PGF2 alfa kezelés követ) 72-84 órával a szivacs eltávolítása után kezdődik. Az ovulációk szinkronizálása céljából az utolsó FSH injekcióval egy időben lehet buszerelint (GnRH agonista) adni (MENCHACA és mtsai, 2007).

2.3.5. A szuperovuláció eredményességének kapcsolata a petefészek folliculáris státuszával

Ma már mindenki által elfogadott, hogy a szuperovulációs hormonkezelés megkezdésekor a petefészek ún. folliculáris státusza (jelenlévő folliculusok száma és állapota/érettsége) hatással van a kezelés eredményességére (hasznos embriók száma). Megfigyelések szerint a gonadotrop hormonnal való kezelés megkezdésekor a petefészekeken lévő kis vagy közepes méretű (2-3 mm) tüszők száma elősegíti a nagyobb ovulációs arányt. Ugyanakkor a szuperovulációs kezelés kezdetén a petefészekeken található nagy (≥ 6 mm) tüszők száma negatívan korrelál az átültethető embriók számával. Ez az összefüggés szolgált alapjául a következő kísérletsorozatnak: GnRH agonistát vagy antagonistát kombináltak progesztagén kezeléssel, az endogén gonadotropintermelés elnyomása és a 2 mm-nél nagyobb tüszők fejlődésének leállítása céljából. Ez a kezelés a nagy (≥ 6 mm) tüszők fejlődését megakadályozza, a kicsik (1-2 mm) számát megduplázza, és így az exogén FSH-ra adott válaszreakció 50%-kal javult (COGNIÉ és mtsai, 2003).

Mivel az embriókinyerés sebészi úton történik (medián laparotómia vagy laparoszkópia) a felesleges műtét elkerülése céljából fontos, hogy előre megismerjük a hormonkezelésre kapott petefészek reakció minőségét. A folliculusok fejlődéséről információt kaphatunk ultrahangos vizsgálattal, vagy az embriókinyerés előtt egy nappal elvégzett progeszteron meghatározással kiszűrhetjük a kezelésre nem reagált és a nagyon jól reagált állatokat (>9 sárgatest) (ASHWORTH és mtsai, 1989; AMIRIDIS és mtsai, 2002).

Régóta ismert, hogy szuperovuláltatott donorok esetében a cervikális MT - bár a rutin állattenyésztésben jó eredményességgel alkalmazzák - nem nyújt kielégítő termékenyülési arányt. A laparoszkópiás MT, amikor a friss vagy fagyasztott spermát közvetlenül a méh üregébe juttatják, viszont igen (EVANS és mtsai, 2002; HIWASA és mtsai, 2009). Az endoszkópos intrauterin MT-t általában 48 órával a progeszteron/progesztagén blokádnak megszüntetése után végzik (HILL és mtsai, 1998; CSEH és SOLTI, 2001).

2.3.6. A laparoszópos embriókinyerés és EÁ

A technológiai fejlesztés terén végzett munka eredményeként könyvelhető el a különböző, laparoszóp segítségével végzett, MT-i, majd később embriókinyerési- és átültetési módszerek kialakítása. A laparoszópiás MT-el szemben az utóbbi két technikát még ma is csak ritkán alkalmazzák (és elsősorban csak kísérleti körülmények között). Különösen nem veszik igénybe őket gyakorlati körülmények között végzett kereskedelmi EÁ programokban.

A laparoszópiás módszer nagy előnye, hogy egy minimálisan invazív, biztonságos technikáról van szó (DUKELOW és ARIGA, 1976, HARRISON és WILDT, 1980). Kétségtelen tény, hogy a laparoszóppal végzett EÁ esetében kevesebb lesz a műtét utáni szövődmény, sokkal gyorsabb a sebgyógyulás, és ennek következtében az állatok több programba vonhatók be, mint a sebészi (medián laparotómia) EÁ-nél (SEEGER, 1973).

A laparoszópiás technika kifejlesztésének célja volt, hogy 1) elősegítsék az EÁ-i módszer terjedését (csak kisebb műtéti beavatkozásról van szó), 2) a juhokon tesztelt endoszópos embrióátültetési technika később nem domesztikált fajokra is adaptálható legyen.

BARIL és mtsai (2009, személyes közlés) szerint a laparoszópos technikával- annak számos előnye ellenére- mintegy 15%-kal kevesebb embrió mosható ki, mint sebészi módszer alkalmazásakor, továbbá lassabban is kivitelezhető, mint a medián laparotómiával végzett embriómosás. A laparoszópos technika mind az in vivo, mind az in vitro előállított embriók átültetésére is alkalmazható, sőt, COGNIÉ (1999) szerint az így elért fogamzási % (70-75%) hasonló, mint amikor mid-ventrális laparotómiával (sebészi módszerrel) ültetünk át embriót.

A 80-as évekbeli elvárások szerint a juh EÁ-ben alkalmazott laparoszópiától előrelépést reméltek. További várakozásként fogalmazódott meg az eljárással szemben, hogy magasabb vemhesülési eredményt lehessen elérni vele (SCHIEWE és mtsai, 1984). A nagy juhtenyésztő országokban (Ausztrália, Új- Zéland, Franciaország, Nagy-Britannia stb.) a laparoszópiás EÁ technika a 90-es évektől kezdődően gyorsan terjedt. Hazánkban is megkezdődtek az endoszóp reprodukciós beavatkozásokban történő alkalmazásával kapcsolatos kísérletek (MAGYAR és mtsai, 1989; CSEH és mtsai, 1990, 1991; MAGYAR, 1994).

A juhembriók kinyerésénél a laparoszópiát hazánkban először CSEH és mtsai (1991) alkalmazták: először a hasfal bal alsó részén – a lágyék és a köldök között- egy

kb. 120 mm hosszú, speciális hüvellyel ellátott trokárt szúrtak a hasüregbe. A trokár végéhez kompresszort csatlakoztattak, és kb. 2 liter szűrt steril levegő bejuttatásával pneumoperitoneumot hoztak létre. Ezt követően a trokárt eltávolították, és helyére bevezették a laparoszkópot, amit nagy intenzitású száloptikás fényforráshoz csatlakoztattak. A has jobb oldalán két másik trokárt szúrtak be. Az egyiket keresztül a 340 mm hosszú, 3 mm átmérőjű atraumatikus fogót vezették be, amivel a méhet rögzítették. A másik a 310 mm hosszú, 3 mm átmérőjű hegyes végű fémkatéter bejuttatására szolgál, amivel a méh falát szúrták át. A laparoszkóppal felkeresték a méhet, és állandó vizuális kontroll mellett a fémkatéter hegyével óvatosan átszúrták a méh falát. Ezen a szűrési csatornán keresztül vezették be az ún. „háromutas” embriókinyerő katétert. Miután a ballon felfújásával a katétert a méhen belüli helyzetében rögzítették, az atraumatikus fogóval a méhet elengedték, és „átfogtak” vele a méhszarv és a petevezető találkozási pontjára. Ezután a méhszarvakat külön-külön kb. 50 ml tápfolyadékkal átöblítették.

Mindössze a három bőrseb zárására volt szükség a beavatkozás végén, csomós varratokkal.

(A franciaországi INRA, Nouzilly kutatócsoportban eltöltött gyakorlatom során arra a következtetésre jutottam, hogy valóban kevesebb műtét utáni szövődémmel jár a laparoszkópos embriókinyerés és átültetés juhban, de lassabban kivitelezhető, és az esetek többségében kevesebb embrió mosható ki méhszarvanként a donor anyajuhokból, mint sebészi embriókinyerés esetében.)

A laparoszkóppal végzett embrióátültetést szintén CSEH és mtsai (1991) alkalmazták először Magyarországon. Első lépésként pneumoperitoneumot kell létrehozni, ezt követően a has jobb oldalán beszúrt két trokár közül az egyiket az atraumatikus fogót, a másikon a 370 mm hosszú, 3 mm átmérőjű embrióbeültető katétert vezették be. Az atraumatikus fogó segítségével szabaddá tették a petefészkeket, és a laparoszkóppal ellenőrizték a rajtuk található ciklusképleteket. Ezután a fogóval rögzítették a sárgatesttel megegyező oldali méhszarvat, majd a beültető katéter végén található tüvel a méh falát átszúrva befecskendezték az – előzetesen a katéterbe felszívott- embriót a méh lumenébe.

(Említést érdemel az ún. fél-laparoszkópos technika is, amely a laparoszkópos embrióátültetéstől abban különbözik, hogy az atraumatikus fogóval a petefészkeket és a méhszarvat elő is húzzuk a kissé kitégített műtéti seben keresztül, amelyet előzetesen a

trokárral "okoztunk" és így, a hasüregen kívül történik az embrió méhbe fecskendezése. Így felgyorsítható az eljárás, és a műtéti seb nagysága majdnem megegyezik azzal, amelyet a trokár beszúrása okoz /JOOSTE, 2008- személyes közlés/.)

Két tudományos közlemény a laparoszkópiás és a sebészi EÁ eredményességét összehasonlítva hasonló vemhesülési arányról számol be (STEFANI és mtsai, 1990; SANG és mtsai, 2008).

Egy másik kutatócsoport ivarzásszinkronizálás után laparoszkópiás EÁ-t végzett 18 lacaune anyajuhon. Átlagosan 10 percre volt szükség a beavatkozáshoz, a recipiensek 37%-a vemhesült, és összesen 15 bárány született. A vemhesülési arány valamelyest alacsonyabb volt, mint a hagyományos sebészi EÁ alkalmazásakor (BESENFELDER és mtsai, 1994).

Az ún. kereskedelmi céllal végzett embrióátültetéseknél még napjainkban sem alkalmazzák kiterjedten a laparoszkópiás eljárást, hiszen a módszer rendkívül nagy rutint igényel (képzett munkacsoport), eléggé idő- és munkaigényes, költséges berendezés kell hozzá és az eredményekben lényeges javulás nem mutatkozik.

A sebészi és az endoszkópos EÁ technikák mellett biztató kísérleteket folytatnak az ún. nem sebészi módszerrel (transzcervikális). Napjainkban azonban az eljárásnak a gyakorlati körülmények között történő alkalmazásának még a MT esetében sem jött el az ideje (BARRY és mtsai, 1990; MCKUSICK és mtsai).

2.3.7. A sebészi embriókinyerés és EÁ

Az EÁ terjedésének a juh fajban gátat szab, hogy az embriókinyerés- és átültetés egyaránt műtéti úton median laparotómiával történik, ellentétben a szarvasmarhával, ahol a nem sebészi eljárást lehet alkalmazni. Juhban a cervix anatómiai felépítése nagymértékben megnehezíti a transzcervikális katéterezési technikát. Sajnos a műtéti eljárásnál 2-3 alkalom után előfordulhat, hogy a donort már nem lehet további programban szerepeltetni (összenövések alakulnak ki). Ugyanakkor hazai adatok bizonyítják, hogy kellő körültekintéssel végzett sebészi embriókinyeréseket követően a donorok későbbi reprodukciója nem szenved kárt (CSEH és DOHY, 2003, AMIRIDIS és CSEH, 2012). Sebészi embriókinyerést és átültetést alkalmaztak CSEH és mtsai (1990) "magyarországi őshonos juhajták korszerű biotechnikai módszerekkel történő szaporítása" című pályázattal kapcsolatos munkájuk során. Egy későbbi közleményben a Történelmi Termelőszövetkezetben az EÁ programot követően figyelemmel kísérték a

donorok szaporodásbiológiai életét és a tapasztalatok azt bizonyítják, hogy a beavatkozás nem befolyásolta hátrányosan a donorok egészségét/reprodukcióját, hiszen azok 71%-a programot követő egy éven belül leellett (CSEH és SEREGI, 1993; CSEH és SOLTI, 2001).

FLORES-FOXWORTH és mtsai 1992-ben a nem sebészi (transzcervikális) és sebészi EÁ összehasonlító vizsgálatában kecskék esetében nem találtak szignifikáns különbséget a két módszerrel elért vemhesülési eredmények között, de általánosságban az mondható el, hogy a transzcervikális MT és EÁ módszere még fejlesztésre szorul, amely a cervix hormonkészítményekkel való tágításán alapulhat (CANDAPPA és BARTLEWSKI, 2011).

Az ún. átmeneti technikák esetében a szakemberek igyekeztek egyesíteni a medián laparotómia és az endoszkópos technika előnyös tulajdonságait. Kínai kutatók 2008-ban egy ún. „egyszerűsített mini-laparotómiás” módszert dolgoztak ki. A módszerrel végzett embrióátültetések során szinte azonos vemhességi eredményeket értek el, mint a laparotómiás átültetésnél (48 vs. 46%) (LI és mtsai, 2008).

2.3.8. Juvenile in vitro embryo transfer

Említést érdemel a juh embrióátültetés területén az utóbbi évtized egyik új vívmánya, az ún. juvenile in vitro embryo transfer (JIVET). A technológia lehetővé teszi az állomány legkiválóbb egyedeinek az eddigiéknél gyorsabb szaporítását, a generációs intervallum minden eddiginél gyorsabb rövidítését. A JIVET lehetővé teszi, hogy már 4-8 hetes bérányok petesejtjeinek kinyeréséből életképes utódok jöhessenek létre. KELLY és mtsai (2005 a,b) szerint egy donor béránytól átlagosan 9-13,9 életképes magzat nyerhető, sőt, a donorok, elérve a tenyészérettséget, ugyanolyan reprodukciós teljesítményt nyújtanak, mint a kísérletben szereplő kontroll állatok. A hormonkezelés, és a petesejtek aspirációja sem járt semmilyen negatív következménnyel a donor bérányok későbbi fejlődését, és szaporodásbiológiáját tekintve. A módszert GOU és mtsai (2008) Kínában is adaptálhatónak vélték, és az ország juhtenyésztésében nagyfokú genetikai előrehaladást remélnék tőle. A kutatócsoport eredménye átlagosan 4,87 életképes magzat donor bérányonként. Fontos megjegyezni azt is, hogy az éretlen bérány petesejtek fejlődési erélye messze elmarad a felnőtt állatokétól (COGNIE és mtsai, 2003; PTAK és mtsai, 2006), valamint, hogy a kezelt állatok igen nagy számban (27-72%), nem mutatnak értékelhető válaszreakciót a szuperovulációs kezelésre (PTAK

és mtsai, 2003; VALASI és mtsai, 2007). Annak érdekében, hogy a rosszul, vagy egyáltalán nem reagáló donorok feleslegesen ne essenek át a laparotómián, VALASI és mtsai (2007) az operáció előtt 12 órával ösztradiol-szint mérést javasolnak.

Összefoglalva az EÁ eredményességét számos tényező befolyásolhatja, amelyek közül a legfontosabbak: a szuperoovulációs hormonkezelés eredményeként „megtermelt” embriók száma és minősége (ez önmagában több tényezőtől függhet, mint például a donor fajtája, az alkalmazott hormonkészítmény és hormonkezelési protokoll, stb.), az embriókinyerés- és átültetés technikájának hatékonysága, az állatok tartási és takarmányozási körülményei, donorok és recipiensek életkora/kondíciója (CSEH és SOLTI, 2001; BARI és mtsai, 2002).

2.4. Embriómélyhűtés

Az embriómélyhűtés egy olyan kulcstechnológia, amely képessé teszi a biotechnikát és a biotechnológiát a továbbfejlődésre, valamint lehetővé teszi, hogy a nagy értékű embriók világszerte elérjék a nemzetközi piacokat. A mélyhűtés nem csak a humán asszisztált reprodukcióban létfontosságú, de a kihalással fenyegetett fajok védelmében is kulcsszerepet tölt be. Az elmúlt kb. 40 év vívmányai segítségével az embriómélyhűtés szinte minden faj esetében sikeresen alkalmazható, habár fontos megemlíteni, hogy a leggyakrabban alkalmazott módszerek sokszor nem tekinthetőek a legkorszerűbbeknek (DINNYÉS és mtsai, 2006).

2.4.1. Az embriómélyhűtés előnyei

Az embriómélyhűtés legfontosabb gyakorlati előnyei az alábbiakban foglalhatók össze: 1) embrióbankok hozhatók létre, ahol megőrizhetjük a genetikailag értékes, rekorder egyedek, kihalással fenyegetett, fogságban tartott vadon élő ritka fajták genetikai anyagát embriók formájában és bármikor mozgósíthatjuk azokat; 2) törzsállományok létrehozása és üzemeltetése; 3) a fagyasztott embriók formájában bonyolított tenyészállat kereskedelem előnyösebb, mint a „friss” embrió; 4) a mélyhűtött embriókkal a beültetés tértől és időtől függetleníthető; 5) lényegesen rugalmasabbá tehető az EÁ technológia, hiszen az embriótermelés és az embrió felhasználás térben és időben különválasztható (munkaszervezési előnyök, kevesebb recipiens állatot kell

tartani, csökkennek a költségek); 6) kutatás szolgálata; 7) fagyasztott állapotban, mínusz 196°C-on gyakorlatilag korlátlan ideig eltárolhatók az embriók (az embrió fejlődése megáll abban a stádiumban, amelyben a fagyasztást végzik („*Csipke Rózsika álmát alussza*”), majd felolvasztás után tovább folytatódik).

Az utóbbi pár évben egy eddig kevésbé ismert aspektusa is megjelent a szaporítóanyagok mélyhűtésének. A molekuláris genetika és a molekuláris biológia fejlődésével új, mutáns egér, *Drosophila*, *Medaka* és zebrahamal törzsek ezreit állították elő különböző technikákkal. Az egereknél például olyan számú törzset kellene fenntartani a kutatásokhoz, amely mind költséget, mind eszközöket tekintve lehetetlenné vált- ebből következően a törzsek in situ fenntartását felváltotta az ex situ- a genetikai anyagaik megőrzése mélyhűtve, embrió és spermabankok formájában (MAZUR és mtsai, 2008).

2.4.2. Az embriómélyhűtés módszerei

Az alkalmazott hűtési sebesség alapján a szakirodalom alapvetően két hűtési technológiát különböztet meg: 1) hagyományos vagy lassú módszer, és 2) „gyors vagy ultra gyors” eljárás, amit igen gyakran vitrifikációnak hívnak. A „lassú” eljárás esetében az embriókat mínusz 30-40 °C-ig hűtik fokozatosan, lassú sebességgel (0,3-0,8°C/perc), majd erről a hőmérsékletről helyezik az embriókat folyékony nitrogénbe, mínusz 196°C-ra.

Hagyományos mélyhűtési technikával, egér embriókat fagyasztva érték el az első sikereket 1972-ben (WHITTINGHAM és mtsai, 1972) és napjainkban is még igen kiterjedten alkalmazzák ezt az eljárást. Az első juh embriókat is lassú protokollal mélyhűtötték (WILLADSEN és mtsai, 1976; WILLADSEN, 1977). Ennél a módszernél speciális programozható mélyhűtő berendezést kell használni, a sejtet a védőanyagot alacsony koncentrációban tartalmazó fagyasztó oldatban mélyhűtik, amelyben ennek következtében kis mennyiségben ugyan, de képződnek jégkristályok.

2.4.3. Krioprotektív anyagok

Az embriómélyhűtésnél alkalmazott oldatokat ún. krioprotektív anyaggal vagy anyagok kombinációjával (pl. a vitrifikációnál) kell kiegészíteni. A védőanyagoknak két típusát különböztetjük meg, attól függően, hogy sejten belül (intracelluláris) vagy kívül (extracelluláris) fejtik ki védőhatásukat a fagyasztási sérülésekkel szemben.

A legáltalánosabban használt intracelluláris krioprotektív anyagok a glicerin, propilén-glikol, etilén-glikol és a dimethyl-sulfoxid (DMSO), míg az extracelluláris védőanyagok közül leggyakrabban a szacharózt, polietilén-glikolt, trehalózt alkalmazzák. Felolvasztás után a krioprotektív anyag(ok) embriókból való kivonása nem maradhat el (a spermánál erre nincs szükség), hiszen az anyagok magasabb hőmérsékleten toxikusak az embrió számára.

Sajnos a különböző haszonállatfajok embrióinak fagyaszthatósága között jelentős különbségek vannak, így az egyik faj embrióira kidolgozott technológiát nem lehet egy az egyben másik faj embrióival sikeresen alkalmazni: pl. a szarvasmarha, juh és az ember embriói igen jó hatékonysággal mélyhűthetők, míg ugyanez pl. a sertés és a ló embriókról nem mondható el (NIEMANN és RATH, 2001).

A krioprotektív anyagok közül az etilénglikolt már korábban is sikeresen használták juh embriók mélyhűtésénél is (MCGINNIS és mtsai, 1993). Más védőanyagokkal összehasonlítva, az etilénglikol még kifejezetten magas koncentrációkban sem toxikus. Könnyen behatol az embrió sejtjeibe, és megakadályozza intracelluláris jégkristályok képződését (SZÉLL és SHELTON, 1986). Fontos megemlíteni továbbá, hogy a juh és szarvasmarha embriók jobban átjárhatóak az etilénglikol, mint a glicerol vagy a propilénglikol számára (SZÉLL és SHELTON, 1986).

A glicerol és az etilén-glikol, mint krioprotektív anyag hatását vizsgálva juh embriókon, akkor tapasztalható a magasabb embrió túlélési %, amikor az expandált blasztocisztát etilén-glikollal fagyasztották (SONGSASEN és mtsai, 1995; COCERO és mtsai, 1996). Összehasonlítva a vitrifikáció és a konvencionális hűtés hatását az embriók túlélési %-ára, az utóbbi eljárás magasabb túlélési százalékot eredményezett (DE PAZ és mtsai, 1994).

2.4.4. A vitrifikáció

A „gyors vagy ultra gyors”, ún. vitrifikációs eljárásnál az embriókat megfelelő előkészítést követően közvetlenül merítik a folyékony nitrogénbe, anélkül, hogy ezt megelőzően beiktatnának egy lassú mélyhűtési szakaszt. Ennél a módszernél a védőanyagok kombinációját nagy koncentrációban tartalmazó fagyasztó oldatban mélyhűtik az embriókat, igen gyors hűtési sebességgel. A tömény oldat és a nagyon gyors hűtés következtében az oldatban nem alakulnak ki jégkristályok, hanem üvegszerű anyagot képezve megszilárdul (megfagy). A módszert éppen ezért nevezik

vitifikációnak, ami arra utal, hogy a gyors hűtésnek és a magas koncentrációnak köszönhetően nagy viszkozitásúvá válik az oldat, aminek az eredményeként üvegszerű anyagot képezve, jégkristályok kialakulása nélkül szilárdul/fagy meg (RALL és FAHY, 1985; RALL, 1987; SZÉLL és mtsai, 1990).

Az első közlemény vitifikált embrióból származó bárány születéséről 1990-ben jelent meg (SZÉLL és mtsai, 1990). A módszer előnyei között szokták megemlíteni, hogy nem kell hozzá speciális fagyasztó berendezés és megfelelő gyakorlat esetén gyorsan kivitelezhető. Ugyanakkor, nagyon nagy gyakorlatot igényel, hogy a magas védőanyag koncentráció miatt az embriók/petesejtek csak rövid időt töltsenek a védőoldatban (kevesebb, mint 1 perc) a folyékony nitrogénbe való behelyezés előtt, hiszen a magas koncentráció toxikus az embrióra.

Számos tudományos cikk látott napvilágot az elmúlt években a vitifikációval és annak gyakorlati alkalmazásával kapcsolatosan:

Az ovum pick up (OPU), in vitro embrió előállítási procedúra és a vitifikáció embriókra gyakorolt együttes hatásáról jelentettek meg tudományos közleményt, amelyben a szerzők az embriók túlélési %-a és a bárányozási % alapján a módszert alkalmazhatónak vélik (PTAK és mtsai, 1999).

Egy tanulmányban két kísérletet állítottak be arra vonatkozóan, hogy üzemi körülmények között mennyire eredményes a juh embriók vitifikációja. Eredményeik szerint a frissen kimosott és átültetett, illetve a vitifikáció után átültetett embriók túlélési %-a és a vemhességi ráta szignifikánsan nem különbözött két módszer esetében (BARIL és mtsai, 2001).

Egy kutatócsoport juh embriók vitifikációjára dolgozott ki egy új eljárást, és gyakorlati alkalmazhatóságának vizsgálatát tűzte ki célul. In vivo előállított embriókat etilén-glikollal fagyasztottak, majd felolvasztás és a krioprotektív anyag eltávolítása után standard protokoll szerint recipiensekbe ültették (kontroll csoport). Az embriók egy másik csoportját open-pulled straws (OPS) ba töltötték, majd hirtelen felolvasztás után, az OPS-t, mint katétert használták a transzplantációhoz. A harmadik csoportba tartozó in vivo és in vitro nyert embriókat OPS- be töltve vitifikálták, majd átültették az előző metodika szerint. A bárányozási arány az első esetben 59% volt, az in vivo nyert,

vitrifikált embriók esetében 56%, míg az in vitro előállított, vitrifikált embriók esetében 20% (ISACHENKO és mtsai, 2003).

Az embrió fejlődési stádiuma és mélyhűthetősége között juh fajban is összefüggés van, mégpedig a fejlettebb stádiumok jobban tolerálják a vitrifikációt, mint a morula vagy a kompakt morula (NAITANA és mtsai, 1995). GIBBONS és mtsai (2011) által alkalmazott (Cryo-tips) vitrifikációs technika esetében nem volt szignifikáns különbség a morula és a blasztociszta vitrifikációval történő mélyhűthetősége között (az embriók túlélése és a vemhesülési ráta esetében sem).

Juh petesejtek fagyasztásakor egy új technika, az ún. cryoloop vitrifikáció használata is lehetséges. Felolvasztás után in vitro termékenyítve a petesejteket, nincs különbség a termékenyülési %-ban a kontroll csoporthoz képest (MOAWAD és mtsai, 2008).

A vitroloop vitrifikációs módszerrel és egy új összetételű, etilén-glikolt, propilén-glikolt, Ficoll-t és szacharózt tartalmazó védőoldattal történő egér embrió vitrifikációról is közöltek már eredményeket. Megállapították, hogy a VitroLoopTM módszer biztonságos, jó hatékonysággal alkalmazható vitrifikációs eljárás. Az új összetételű vitrifikációs oldat, amelyben a DMSO-t propilén-glikol helyettesíti, a korábbi védőoldathoz hasonlóan magas túlélési és továbbfejlődési arányt biztosít, mely eredmények alapján a módszer a későbbiekben alkalmazható lesz pl.: juh embriók vitrifikációjánál is (KLAMBAUER és mtsai, 2009).

Egyedül a vitrifikáció tekinthető olyan embriófagyasztási technikának, amely amiatt, hogy nem igényel speciális berendezéseket, alkalmas a rutinszerű, üzemi körülmények közötti felhasználásra. A vitrifikáció az in vitro előállított, biopszián átesett és klónozott embriók mélyhűtésére is alkalmasabb (COGNIÉ és mtsai, 2003).

Az embriófagyasztás fejlődése (vitrifikáció) nemcsak a szarvasmarhatenyésztést forradalmasította, hanem a juhtenyésztésben is hasonló eredményekre számíthatunk a közeljövőben. Ugyanakkor az is megemlítendő, hogy az in vitro előállított és mikromanipulált embriók túlélése jelentősen csökken fagyasztás során az in vivo nyert embriókhoz képest (DOBRINSKY, 2002).

A számos, fent említett tudományos eredmény ellenére kiskérődzőkben az embrióátültetési és mélyhűtés alkalmazása nem olyan elterjedt, mint pl.: a szarvasmarhatenyésztésben (THIBIER, 2000), ennek legvalószínűbb oka pedig az, hogy a költségek nincsenek egyensúlyban a tenyészállatok értékével (COGNIE és mtsai, 2003).

2.5. A juh embrióátültetés eredményessége és a programban szereplő donor és recipiens állatok tartása és takarmányozása közötti kapcsolat

A kérődzők szaporodásbiológiáját, a petesejt és a spermiumok fejlődését, az ovulációt, a termékenyülést, az embriók túlélését/fejlődését, valamint beágyazódását (implantációját) és a vemhesség fennmaradását nagymértékben meghatározza a takarmányozás. Indirekt módon is befolyásolja az állatok táplálkozása a szaporodást, mégpedig egyes hormonok, valamint egyéb, tápanyag-függő metabolitok perifériás vérben mért szintjének emelésével/csökkentésével (ROBINSON és mtsai, 2006).

A takarmányozással befolyásolhatjuk a petesejtet és az embriót körbevevő metabolikus és endokrin környezetet (SANTOS és mtsai, 2008). A programban részt vevő állatok takarmányozásának optimális energia, fehérje, vitamin és ásványianyag ellátást kell biztosítani, elkerülve a túletetést, amely recipiensekben csökkentheti a vemhesülési arányt, donorokban pedig az ovulációs válaszkészséget, a petesejt és az embriók minőségét (MCKELVEY és mtsai, 1988; LOZANO és mtsai, 2003). Megfigyelések szerint anyajuhok 13 héten keresztül, halolajból származó telítetlen zsírsavakkal való etetése növelte a folliculusok, és a jó minőségű petesejtek számát, javította a fagyasztott - felolvasztott petesejtek membránintegritását (ZERON és mtsai, 2002).

Ismert tény, hogy a legelőhöz való hozzáférés növelése 3 héttel, vagy magas fehérjetartalmú takarmány etetése az ivarzás kezdete előtti 6 napban emeli az ovulációs rátát, de mindezek mellett keveset tudunk a takarmányozásnak a petesejt és az embrió minőségére kifejtett hatásáról (KAKAR és mtsai, 2005).

A legújabb kutatási eredmények, amelyek a takarmányozás és a szuperovuláció/EÁ program kapcsolatáról napvilágot láttak, némiképp ellentmondanak a hagyományos juhtenyésztésben bevett gyakorlatnak, amely a reprodukciós teljesítmény javítását a fedeztetés előtt 3 héttel a takarmányadag növelésével (plusz

energia bevitel, „flushing”), vagy 5-8 nappal az ovuláció előtt magas fehérjetartalmú takarmány etetésével próbálja elérni. Ugyanakkor fontos hangsúlyozni, hogy az ET programra előkészített, szuperovuláltatott anyajuh nem hasonlítható össze egy hagyományos tenyésztésben levő fajtársával.

Az előbbieken röviden körvonalazott területekkel kapcsolatos információgyűjtés nagyon fontos, hiszen hozzásegíthetnek bennünket ahhoz, hogy az igényekhez jobban igazodva, magasabb színvonalon tudjuk az állatokat előkészíteni a juh embrióátültető programokra, amivel az eredményességet javítani tudjuk.

2.5.1. A túletetés káros hatásai a szaporodásbiológiában

A donor anyajuhok termékenyítés előtti 20 napos ad libitum etetése egyaránt csökkentette az ovulációs rátát, valamint a kimosott, jó minőségű embriók számát, szemben azokkal a donorokkal, amelyek az életfenntartó adag 0,5 vagy 1,5-szeres mennyiségét kapták (LOZANO és mtsai, 2003). MCEVOY és mtsai (1995) arra az eredményre jutottak, hogy azok a szuperovuláltatott anyajuhok, amelyek az életfenntartó energiaszükséglet 0,6-szorosát kapták a termékenyítés előtti 12 napban, szignifikánsan nagyobb számban „termeltek” jó minőségű embriót, mint társaik, akiket az életfenntartó energiamennyiség 2,3-szorosával láttak el. Tehát juhok esetében a túletetés ugyanolyan negatív hatással van a reprodukcióra, mint a hiányos tápanyagellátás.

A progeszteron szerepe alapvető a korai vemhesség fenntartásában. A túletetés azonban emeli a májbeli vérátáramlást, amely a progeszteron katabolizmusának emelkedéséhez vezet (PARR és mtsai, 1993).

2.5.2. Az elégtelen tápanyagellátás

Az elégtelen, hiányos tápanyagellátás veszélyezteti a folliculusok fejlődését (O'CALLAGHAN és mtsai, 2000), a luteális funkciót (JABBOUR és mtsai, 1991) és az embrió fejlődését (ABECIA és mtsai, 1997). Juhok esetében a hiányos tápanyagellátás alacsony ovulációs rátát eredményez, csökkenti az LH pulzusfrekvenciát (RHIND és mtsai, 1989), ugyanakkor fontos hangsúlyozni, hogy ez a hatás nem rögtön következik be, hanem valószínűleg néhány hónapnyi nélkülözés után (BOLAND és mtsai, 2000).

Az embrióátültető programok szempontjából nem elhanyagolható a jermagzatok in utero és postnatális tápanyagellátása: juhok esetében a vemhesség első 3 hónapjában a hiányos tápanyagellátás (0,5 X életfenntartó) a nőivarú magzatok 20

hónapos kori ovulációs számának drasztikus csökkenéséhez vezetett (RAE és mtsai, 2002). A 6 hetes jerkebárányok 8 hétig tartó hiányos tápanyagellátása akár 3 évig is negatívan befolyásolta az ovulációs rátát (WILLIAMS, 1984). Hasonló tapasztalatokat gyűjtöttek a választás előtti időszakban alkalmazott mindössze 12%-os tápanyagellátás csökkentés esetében (RHIND és mtsai, 1989). Ezek a tények is választ adhatnak arra, hogy miért van/lehet akkora különbség a donor anyajuhok szuperovulációs kezelésre adott válaszreakciója között.

A juh fajban igen gyakori jelenségnek számító korai embrió mortalitás is összefüggésbe hozható a fedeztetés/mesterséges termékenyítés körüli elégtelen takarmányellátással (DUNNE és mtsai, 1999).

Az anyajuhok esetében több olyan ún. „érzékeny ablak/időszak” van, amikor a szaporodási funkciók és az ovulációs arány különösen érzékeny a tápanyagellátottságra. Az első ilyen a fedeztetés/mesterséges termékenyítés előtti 6. hónap, amikor a petefészkek tüszőállománya a primordiális stádiumból fejlődésnek indul. A másik fontos időszak az ovuláció előtti 10 nap, amikor az ún. „flushing”-gal (plusz energia bevitel) befolyásolható az ovulációs szám (ROBINSON és mtsai, 2006). Az ún. „ultrarövid flushing” technika esetében csak az ovuláció előtti 8-4. napban elegendő megemelni az anyajuhok takarmányadagját (fehérjebevitel) a kívánt hatás elérése érdekében (VINOLES GIL, 2003). KAKAR és mtsai (2005) azt is megállapítják, hogy feltételezhetően a petesejt és az embrió is - befolyásolva az ET programok eredményességét - képes reagálni mind a hosszú (krónikus), mind a rövid (akut) távú takarmányozási anomáliára (mennyiségi és minőségi ellátási probléma).

A donorok ovulációja körüli időszak 3 szakaszra osztható: 1. az ovuláció előtti -12.-től a -6. napok, amikor a fejlődő tüszők száma még befolyásolható takarmányozással. 2. az ovuláció előtti 6 nap: a ≤ 2 mm tüszők növekedése a preovulációs méretig. 3. szakasz: az ovuláció utáni 6 nap: az embrionális genom aktivációja és a sejtosztódás kezdeti szakasza. KAKAR és mtsai (2005) az ezekben az időszakokban alkalmazott magas-**M** (életfenntartó x 1,5), közepes-**K** (életfenntartó x 1,0) és alacsony- **A** (életfenntartó x 0,5) takarmányadagok hatását vizsgálta. A **KMA** takarmány adagolása az ovuláció körüli 1., 2., és 3. szakaszban eredményezte a legmagasabb hasznos embriószámot a donor állatokban.

Az utóbbi években a kiskérődzőkkel kapcsolatos kutatásokban az egyik legfontosabb kérdés, hogy milyen takarmányozási stratégiákat célszerű felállítani/követni, hogy az asszisztált reprodukciós technikák alkalmazása (kossperma fagyasztása, valamint az EÁ programokba bevont donor anyajuhok szuperovulációja és a recipiensek vemhesülése) minél eredményesebb legyen (ROBINSON és mtsai, 2006).

Összességében az állapítható meg, hogy ami kívánatos a hagyományos tenyésztésben, és amit az ún. „flushinggal” (plusz energia bevitel) el tudunk érni (élénkebb ivarzási tünetek, magasabb az ivarzők aránya és az ovulációs arány), az EÁ program esetében negatív hatással van az embrió minőségére és az embriók fejlődésére. Fontos tehát úgy megválasztanunk a donor anyajuhok takarmányadagját, hogy az a szuperovulációt is támogassa, de ne legyen rossz hatással az embrió fejlődésére. A gyakorlatban ez azt jelenti, hogy optimális, fehérje, energia, ásványianyag és vitaminellátásról kell gondoskodnunk a donor anyajuhok esetében már legalább 8-12 héttel a tervezett programok előtt (elkerülve a túletetést), de a szuperovuláció sikere és az embriók fejlődése szempontjából a legjobb, ha az ovuláció környéki napokban a takarmányadagot az életfenntartó alá csökkentjük.

2.6. A juh embrióátültetés eredményessége és a vér progeszteron (P4) szintjének alakulása

A perifériás vér P4 szintje alapvető szerepet játszik a korai embrionális fejlődésben, az implantációban és a vemhesség fenntartásában egyaránt. Juh fajban a vemhesség első 50 napja alatt a sárgatest termeli és biztosítja a zavartalan vemhesség fenntartásához szükséges P4 szintet. A recipiens juhok plazma progeszteron koncentrációja összefüggésben van az ovulációs számmal/sárgatestszámmal (ASHWORTH és mtsai, 1989), ugyanakkor a petefészken levő sárgatestek száma nincs összefüggésben az embriók túlélési arányával a recipiens anyajuhokban (BARI és mtsai, 2002). Valószínűsíthetően csak egy minimum plazma P4 koncentrációra van szüksége a recipienseknek, ami biztosítja az embriók túlélését, hasonlóan a szarvasmarhához, ahol a tapasztalatok szerint a minimum P4 érték 5-8 ng/ml (REMSEN és mtsai, 1982; PETHES és mtsai, 1983; NIEMANN és mtsai, 1985; NORTHEY és mtsai, 1985). Szarvasmarhák esetében azt is kimutatták, hogy az embriók túlélési aránya a plazma P4

koncentrációjának emelkedésével nő (REMSEN és mtsai, 1982), míg juhokkal kapcsolatban ilyen jellegű eredményeket még nem közöltek. Az anyajuhok egymást követő vemhességeiben azonban számottevő különbségek tapasztalhatóak a plazma P4 koncentrációt illetően (ASHWORTH és mtsai, 1989).

Megfigyelések szerint a progeszteron vérplazmában mért koncentrációját befolyásolja a takarmányozás (PARR és mtsai, 1987; MCEVOY és mtsai, 1995). A megemelt preovulációs takarmányadag megnöveli a follikulum méretét, és a képződő sárgatest progeszterontermelő képességét. Ugyanakkor, az ovuláció utáni túletetés olyan mértékben csökkentheti a perifériás vér P4 koncentrációját, ami már veszélyeztetheti az embrió túlélését (ROBINSON és mtsai, 2002).

A P4 vitathatatlanul az egyik legfontosabb tényező a korai vemhesség fenntartásában, és a perifériás vér magasabb progeszteron koncentrációja a vemhesség első 6 napjában megnöveli a magzat méretét (KLEEMANN és mtsai, 1994).

Üszőkkel kapcsolatban végzett kutatások azt bizonyítják, hogy az energiatápusz javításával a tüsző szteroid termelése megemelkedik, azonban az életfenntartó szintet nem sokkal meghaladó energiaellátottság esetén megindul a szteroid hormonok (pl.: P4) katabolizmusa. Mivel ezekben az esetekben az FSH szint nem változik, a romló szuperovulációs eredmények lehetséges magyarázata az, hogy a szövetek gonadotropinokkal pl. a petefészek FSH és LH hormonokkal szembeni érzékenysége megváltozik (SANTOS és mtsai, 2008).

A progeszteron tehát az egyik legfontosabb tényező a korai vemhesség fenntartásában, és perifériás vérben mért koncentrációja befolyásolja a donor és recipiens anyajuhok EÁ programokbeli teljesítményét.

2.7. A juh embrióátültetés eredményességét befolyásoló új tényezők: metabolikus hormonok perifériás vérben mért szintje

2.7.1. IGF-1 és inzulin

Emlősökben az insulin-like growth factor (IGF-1) termelésére számos szövet képes, és a hormon endokrin, parakrin és autokrin funkciókkal/hatásokkal egyaránt rendelkezik (STUART és PAGE, 2010).

A szarvasmarha embriók in vitro maturációja során a médiumhoz adott IGF-1 elősegítette a blasztociszta stádiumig való fejlődést (SIRISATHIEN és mtsai, 2003),

emelte a blasztoociszta sejt számot (MAKAREVICZ és MARKKULA, 2002), csökkentette az apoptotikus blasztomerek arányát (SIRISATHIEN és BRACKETT, 2003). A preimplantációs szarvasmarha embriók IGF-1-gyel való kezelése megnövelte azok hőstressz elleni rezisztenciáját (JOUSAN és HANSEN, 2007).

Azok a recipiens tehének, amelyekbe IGF-1-gyel „előkezelt” embriót ültettek, magasabb arányban vemhesültek, mint a kontroll társaik (BLOCK és mtsai, 2003). Nem tisztázott még, hogy az IGF-1 jótékony hatása az embriófejlődés támogatásán, vagy a hőstressz kivédésén keresztül érvényesül. A fentiekkel összhangban, BLOCK és HANSEN (2007) megállapították, hogy az IGF-1-gyel kiegészített tápfolyadékban tenyésztett szarvasmarha embriók ellenálltak a hőstressznek, és magasabb vemhesülés volt elérhető velük. Ennek a jelenségnek a magyarázata az lehet, hogy a kezelt embriók jobban képesek tolerálni a magas hőmérséklet/hőstressz által az intrauterin környezetben előidézett változást. Feltételezések szerint több interferon- τ kiválasztásával érik ezt el, amely blokkolja a PGF 2α produkciót. Ugyanakkor BLOCK (2007) azt is leszögezi, hogy az IGF-1 embrió túlélésre és fejlődésre kifejtett hatása az endogén környezet stimulusinak függvényében pozitív és negatív is lehet.

Számos in vitro és in vivo tanulmány alátámasztja, hogy az IGF-1 kontrollálja a folliculus növekedését és fejlődését. IGF-1 „knockout” egerekben megáll a tüszők fejlődése (BAKER és mtsai, 1996). Továbbá juhban, az IGF-1 megnöveli az ösztrogén és/vagy progeszteron produkciót (CAMPBELL és mtsai, 1996). A tüszőfolyadék IGF-1 koncentrációja és a tüsző fejlődési stádiuma közötti kapcsolat szintén beigazolódott juhban (KHALID és HARESIGN, 1996). KHALID és mtsai (2000) azt is leírták, hogy juhban a tüsző granulosa sejtjei IGF-1 termelésre képesek, függetlenül a luteinizáció fokától, valamint ez a mechanizmus növekedési hormon (GH) és FSH adagolásával befolyásolható.

2.7.1.1. Az IGF-1 és inzulin termelődése és a takarmányozás kapcsolata

A petevezető váladékában, és a tüszőfolyadékban található faktorok termelődésére nincs befolyással az anyajuh takarmányozása. Kivéve az IGF-1-et (CLEMMONS, 1997), és kötőfehérjéit (MCCUSKER és mtsai, 1991), amelyek szérumkoncentrációja az alultáplálás miatt csökken, és ez negatív hatással van az embriófejlődésre (MOREIRA és mtsai, 2002).

Más szerzők is alátámasztják (szarvasmarhák esetében végzett kísérletek alapján), hogy a megemelt takarmánymennyiség emeli az inzulin (MOLLO és mtsai, 2007), és az IGF-1 (ARMSTRONG és mtsai, 2002) perifériás vérben mért szintjét, melynek oka, hogy megemelkedik az illó zsírsavak, elsősorban a propionsav mennyisége, és a májban lezajló glükoneogenetikus folyamatokból több glükóz szabadul fel, és kerül be a keringésbe. Mindez fokozza a gonadotrop hormonok tüsző és luteális sejtekre kifejtett hatását.

Ugyanakkor SOSA és mtsai (2009) eredményei azt mutatták, hogy az alultáplálás nem befolyásolta az inzulin és IGF-1 plazma-koncentrációját (de különbség volt a vemhes és nem vemhes anyajuhok IGF-1 mRNS expressziója között).

Az egyedek közötti az IGF-1 és az inzulin koncentrációban megmutatkozó/kialakuló különbségek elegendőek lehetnek ahhoz, hogy eltéréseket okozzanak a follikulusok fejlődésében, az azonos FSH szint ellenére (GONG és mtsai, 2002).

Az intraovarialisan ható, jelentős részben a domináns follikulus ösztrogén termelő képességét meghatározó aromatáz enzimrendszer aktivitását befolyásoló tényezők közül juh esetében is megkülönböztetett figyelmet érdemel a tüszőfolyadék IGF-1 kötőfehérje (IGFBP), inzulin, leptin, valamint talán trijód-tironin (T₃) tartalma (THIERY és mtsai, 2002; SENGER, 2003; HUNTER és mtsai, 2004). Utóbbi metabolikus hormonok nagyrészt a vérplazmából – aktív traszport (IGF-1) vagy passzív filtráció (egyéb metabolikus hormonok) révén – kerülnek a tüszőfolyadékba.

Az ún. „kövér tehén szindróma” megemelkedett inzulin választ okoz a szervezetben, az elhízott tehének szövetei egy idő után nem lesznek érzékenyek az inzulinra, és inzulinrezisztenciát fejlesztenek ki, ami a sejtek glükóz-éhségén keresztül a petesejtek és korai embriók degenerációját okozza (ADAMIAK és mtsai, 2005). A túletetés megemeli a glükóz, inzulin és IGF-1 perifériás vérben mért szintjét is. PINTO és mtsai (2002) eredményeiből azonban az is kiderül, hogy az IGF-1 megemelt koncentrációja az egérembriók pusztulását okozta. ARMSTRONG és mtsai (2003) szerint a magas IGF-1 szint maximalizálja a follikulus méretét, de káros a benne növekvő petesejtre.

2.7.2. Az IGF-1 perifériás vérben mért szintje kérődzőkben

Az IGF-1 szarvasmarha szaporodásbiológiában betöltött szerepéről számos tudományos eredmény jelent már meg (GONG és mtsai, 1993 a; GONG és mtsai, 1993 b; GONG és mtsai, 1994, GONG és mtsai, 1997, TOTEY és mtsai, 1996). Tejelő tehenekben a fent említett metabolikus hormon perifériás vérben mért szintjének mérésével meghatározható az első és második postpartum ovuláció időpontja (FRANCISCO és mtsai, 2003). Arról, hogy a hormon perifériás vérben mért szintje hogyan befolyásolja a szarvasmarha ET eredményességét, VELAZQUEZ és mtsai írnak 2005-ben. Donor üszők esetében az átültetésre alkalmas embriók aránya negatívan korrelál az IGF-1 szinttel, míg donor tehenek esetében az embriószám és a vér IGF-1 szintje között pozitív a korreláció. Az IGF-1 vérplazmában mért szintje, és a hasznos embriószám magasabbnak bizonyult azoknál az üszöknél, amelyek kondíciópontja 2,5 fölött volt. Recipiensek esetében nem mutatkozott összefüggés az endokrin profil és a vemhesülési eredmények között.

Számos in vitro tanulmány alátámasztja, hogy az IGF-1 pozitívan befolyásolja az embrió fejlődését szarvasmarhák esetében (MOREIRA és mtsai, 2002; BYRNE és mtsai, 2002; MAKAREVICH és MARKKULA, 2002; SIRISATHIEN és BRACKETT, 2003), továbbá, hogy az inzulin és az IGF-1 fontos mediátorai a follikulogenezisnek, szteroidszintézisnek, az oocyta érésének és az embriófejlődésnek (GONG és mtsai, 1993 a; GONG és mtsai, 1993 b; GONG és mtsai, 1994; TOTEY és mtsai, 1996).

A hormon gyakorlati körülmények között való felhasználásának lehetőségeiről szuperovuláltatott teheneknél még nem közöltek adatokat. Patkányban egy IGF-1 analóg (LR³IGF-1) javította az FSH-ra adott válaszreakciót, és az ovulációs számot (KHAMSI és mtsai, 2001).

Nem kellően tanulmányozott és tisztázott még az a kérdés sem, hogy az IGF-1 perifériás vérkoncentrációja hogyan befolyásolja az IGF-1 koncentrációt a petefészek, petevezető, méh környezetében, illetve, hogyan alakul a hormon autokrin és parakrin funkciója a perifériás szint függvényében.

HERRLER és mtsai, 1994-ben pozitív összefüggést találtak a keringő IGF-1 szint és a tüszőfolyadék IGF-1 szintje között szuperovuláltatott tehenekben. Ugyanakkor fontos

azt is hangsúlyozni, hogy a perifériás IGF-1 szint valószínűleg a hosszútávú takarmányozási eredetű hatásokat tükrözi.

Az inzulin és az IGF-1 perifériás vérben mért szintje pozitívan korrelál egymással (VELAZQUEZ és mtsai, 2005). Ezt az összefüggést használva SELVARAJU és mtsai (2003) kecskék EÁ programjába exogén inzulin adagolást épített be a szuperovuláció eredményességének javulását remélve ettől. Az inzulinnal kezelt csoportban javult a petefészek válaszreakciója, de az anovulációs nagy tüszők aránya is nőtt, továbbá emelkedett a plazma P4 koncentrációja is. Ezért elképzelhető az inzulin EÁ programokban, gyakorlati körülmények közötti használata, de a módszer (dózis, stb.) még fejlesztésre szorul. Acikliás kecskében az exogén, bőr alá (s.c.) adagolt inzulin beindította a petefészekműködést, elősegítette a tüszők növekedését és az ivarzás jelentkezését (SARATH és mtsai, 2008).

DOWNING és SCARAMUZZI (1997) leírta, hogy az anyajuhoknak a luteális fázis kezdetén adott inzulin infúzió emelte az LH vérben mért szintjét. Más tanulmányokban az inzulinra adott reprodukciós válaszreakció az energia ellátottság függvényében változott: a csökkentett takarmányadagot kapó és inzulin kezelésben részesített üszőknek magasabb lett az ovulációs aránya, szemben az inzulinnal kezelt, de magasabb takarmányadagban részesült egyedekkel (HARRISON és RANDEL, 1986). Ugyanakkor WHITLEY és mtsai (2000) a normál takarmányellátás mellett adott kiegészítő inzulin kezelés alkalmazásakor semmilyen, a reprodukciós teljesítményt javító hatást nem tapasztaltak juhban.

CHILLARD és mtsai (1998) valamint CHEMINEAU és mtsai, 2008-ban azt is megállapították, hogy bizonyos metabolikus hormonok perifériás vérben mért szintje évszakonkénti ingadozást mutat, amely kiskérődzőkben részben magyarázatot adhat a szaporodóképesség szezonálisára is.

Összegzésül kijelenthető, hogy az IGF-1 és inzulin szarvasmarha szaporodásbiológiában, MOET programokban betöltött szerepe részletesen tanulmányozott terület (GONG és mtsai, 1993 a; GONG és mtsai, 1993 b; GONG és mtsai, 1994, GONG és mtsai, 1997, TOTEY és mtsai, 1996), azonban kiskérődzők esetében sem a hormonok parakrin, sem a perifériás vérben betöltött funkciói nem kellően ismertek. Számos, egymással ellentmondó eredmény látott napvilágot a témában (WHITLEY és mtsai, 2000; ARMSTRONG és mtsai, 2003; SELVARAJU és

mtsai, 2003; BLOCK, 2007), mind a szravasmarha, mind kiskérődzők esetében: további kutatások indokoltak tehát a fent említettek tisztázása érdekében.

2.7.3. T3 (trijódtironin) és T4 (tiroxin) perifériás vérben mért szintje és a reprodukció közötti összefüggések

A pajzsmirigy hormonok, a tetrajódtironin vagy tiroxin (T4) és a 3-3'-5- trijódtironin (T3) különböző célszöveteken fejtik ki hatásukat, és a szervezet minden sejtjében stimulálják az oxigén felhasználást és fokozzák a hőtermelést. A két hormon további hatásai a következők: megemelik a szervezetben az alap metabolikus szintet, hogy a sejtek még több glükózhoz jussanak, stimulálják a fehérjeszintézist és a lipid metabolizmust (TODINI és mtsai, 2007).

Háziállatainkban a megfelelő pajzsmirigy működés döntő fontosságú a reprodukciós teljesítmény fenntartásában. Számos kutató észlelt szezonális eltéréseket a pajzsmirigyhormonok perifériás vérben mért szintjében, ami elsősorban szabadon tartott, legelő állatokban jelentős, mint pl.: a kecske (TODINI és mtsai, 1992) és a juh (SOUZA és mtsai, 2002). Ezek a szezonális hormon-koncentrációbeli változások teszik lehetővé az állatok számára, hogy minden esetben alkalmazkodni tudjanak a megváltozott környezeti feltételekhez, tápanyagellátáshoz, és a különböző fiziológiai állapotokhoz.

A plazma T3 és T4 koncentrációja számos kérődző fajban a takarmányellátottság függvénye, még azoknál a fajoknál is, amelyeknél évszakonként igen jelentős eltérések tapasztalhatók a tápanyagfelvételben, testtömegben és reprodukciós teljesítményben. Ilyen vadon élő kérődző faj pl.: a rénszarvas (TIMISJARVI és mtsai, 1994). A T3 megemelkedett szintje a vérben a hipotalamusz szintjén készletnyi nagyobb takarmányfelvételre az állatot, függetlenül az éppen akkori energiaellátottságtól (KONG és mtsai, 2004).

Összességében a perifériás vér T3 és T4 szintje kitűnő indikátorai a kérődzők (és így a juhok) tápanyag ellátottságának (RIIS és MADSEN, 1985). A vér T3 és T4 szintje, mint az energiaellátottság indikátora, megfigyelhető anyajuhok energiahiányos takarmányozása (RHIND és mtsai, 2000), vagy bárányok (ALSHAIKH és mtsai, 1997),

anyajuhok (SHETAEWI és ROSS, 1991) és kosok (ZHANG és mtsai, 2004) kiegészítő takarmányozása esetén is.

TODINI és mtsai (2007) kísérletében a vemhesség alatti megemelkedett T3 és T4 szintről is említést tesznek.

A T3 és T4 perifériás vérben mért szintje, -mint a kiskérődzők energiaellátottságának indikátora- már kellően tanulmányozott terület, azonban ezen hormonok kapcsolata a kiskérődző szaporodásbiológiával még nem ismert. A T3 és T4 perifériás vérben mért szintjének szezonális ingadozása miatt (SOUZA és mtsai, 2002) a pajzsmirigyhormonok valószínűleg a juhok reprodukciós teljesítményét is befolyásolhatják.

3. Anyag és módszer

3.1. A vizsgálatban részt vevő fajta, a magyar merinó bemutatása

Magyarországon az 1700-as évek közepétől tartanak merinó juhokat, a XIX. század közepétől pedig már 10 millióra volt tehető a merinó juhok száma. A magyar merinó elődje, a magyar fésűsmerinó a XX. század ötvenes-hatvanas éveire alakult ki, a fajta nemesítésében a kaukázusi, sztravropoli, grozniji és legnagyobb mértékben az aszkániai merinó vettek részt. Az 1960-as évektől megkezdődött a fajta húsirányú nemesítése is, kezdetben a francia merinó precoce, majd a német húsmerinók felhasználásával. A hetvenes-nyolcvanas években még kapott a magyar fésűsmerinó „egy kis cseppvérkeresztést”. A hosszúgyapjas kent, corriedale és romney fajtákkal a fűrthosszúságot és a rendementértéket, az ausztrál és új-zélandi merinóval a gyapjú finomságát és színét, a boorola merinóval pedig a szaporaságát kívánták növelni (KUKOVICS, 2006).

Magyarországon az utóbbi évtizedekben az anyajuhállomány több, mint 80%-a, a törzskönyvezett anyák kevesebb, mint fele a magyar merinó. A fajta az ország minden területén eredményesen tenyészthető, azt is mondhatjuk rá, hogy igénytelen, mert mostoha körülmények között is termel, de csak jó tartási, takarmányozási viszonyok között várható el nagyobb termelés. Egyes tenyésztők szerint az év bármely szakában üzethető, de a gyakorlat azt mutatja, hogy áprilistól augusztus elejéig anősztrusz jellemzi az anyajuhokat, amikor legfeljebb csak hormonkészítmények alkalmazásával és/vagy megfelelő takarmányozással lehet jó eredményeket elérni. A magyarországi átlagos tartási és takarmányozási körülményeket figyelembe véve a fajta megfelelő szaporulati eredményekkel, jó anyai tulajdonságokkal rendelkezik. A magyar merinó előreláthatólag a jövőben is a magyar juhtenyésztés alapfajtája lesz akár fajtatisztán tenyésztve, akár a különböző keresztezési programok alapfajtájaként. Az árutermelő és a jelenleg szaporítótenyészeteknek nevezett állományok szaporulati tényezőit azonban jelentős mértékben javítani szükséges (KUKOVICS, 2006).

3.2. A kísérlet helyszínének bemutatása

Kísérleteinket Mikepércsen, a Szűcs-Juh Kft. telephelyén végeztük, a „Piaci igényeknek és az éghajlatnak megfelelő juhok tenyésztése és nemesítése” című, *NKFP07A3-NOGYAPJU* azonosítójú NKTH projekt keretein belül. A Szűcs-Juh Kft. vezetője, Szűcs Imre 1980. óta tart és tenyészt juhokat, és a Magyar Juh és Kecsketenyésztő Szövetség tagja. A cég fő tevékenységeként a tenyészállatok tartása és előállítása mellett az export vágóbárány előállítás említhető. A korszerű, európai színvonalú farmon a Kft. 4000 magyar merinó, charollais és brit tejelő anyajuhot tart és tenyészt.

A tenyészteleptől távol külön karantén teleppel is rendelkezik, ahol más cégek részére is többször megvalósították már az import tenyészállatok szabályos karanténozását.

A juhállomány takarmányigényeinek biztosítására a Társaság 1,700 hektáron folytat növénytermesztést, mely piaci árualapot is szolgáltat. A gazdaság az állományméretnek és a folyamatos bővülésnek köszönhetően egyre több embernek tud munkát adni, az alkalmazottak létszáma mára az ötvenet is eléri.

Tenyészállatainak egy része magyar merinó, brit tejelőjuh és charollais fajtájú törzsállomány, melyeket a Magyar Juh és Kecsketenyésztő Szövetség előírásainak megfelelően tart és termékenyít, emellett jelentős árutermelő állománnyal is rendelkezik. A juhok munkaerő-kímélő nyári tartása érdekében 2010-re befejeződött egy legelőkert kialakítása, mely nagyban megkönnyíti a munkát és ahol az alkalmazott technológiára alapozva a csoportos termékenyítés biztonságosan elvégezhető.

3.3. A „Piaci igényeknek és az éghajlatnak megfelelő juhok tenyésztése és nemesítése” című NKTH projekt és a disszertáció kapcsolata

A PhD disszertáció alapjául szolgáló kísérlet *NKFP07A3-NOGYAPJU* azonosítójú NKTH projekt keretein belül és támogatásával valósult meg. A projektben a Szent István Egyetem Állatorvos-tudományi Kar (SZIE-ÁOTK) Andrológiai és Asszisztált Reprodukciós Laboratóriuma Prof. Dr. Cseh Sándor vezetésével vállalta fel az asszisztált reprodukciós és embriológiai munkálatokat (a donorok és recipiensek kiválasztása, ivarzás-szinkronizáció, szuperovuláció és inszeminálás, embriókinyerés, minősítés és beültetés, embrió mélyhűtés, saját és importált mélyhűtött embriók beültetése), míg a Szent István Egyetem Állatorvos-tudományi Kar Endokrinológiai

Laboratóriuma Prof. Dr. Huszenicza Gyula† irányításával végezte a kísérletekkel kapcsolatos endokrinológiai vizsgálatokat. A PhD dolgozatban leírt kísérleteket a Szűcs-Juh Kft. telephelyén végeztük, míg a gyűjtött vérmintákat Budapesten, a SZIE-ÁOTK Szülészeti Tanszék Endokrinológiai Laboratóriumában vizsgálták.

3.4. A kísérleti anyajuhok kiválasztása, tartása és takarmányozása

Az embrióátültetési programba bevont, magyar merinó fajtájú anyajuhok a Szűcs-Juh Kft. mikepércsi telephelyén találhatóak. A donor és recipiens állatok egyaránt klinikailag egészséges, 2-5 éves korú, kb. egy éven belül ellett, közepes vagy jó tápláltsági állapotú anyajuhok voltak. A programban részt vevő állatokat már a kísérletsorozat 2009. februári indulása előtt 6 hónappal kiválogattuk, hogy az állomány többi egyedétől ez alatt az idő alatt elkülönítve kezelhessük, takarmányozhassuk, és vizsgálhassuk őket. A programokra kiválasztott állatok száma 100 volt, a belőlük kialakított csoportból válogattuk ki az EÁ előtt a legmegfelelőbb donor és recipiens egyedeket.

A tenyészetből kiválasztottunk 4 charollais fajtájú 1-2 év közötti kos is, melyeken vasectomiát (az ondóvezeték sebészi úton történő elkötése) hajtottunk végre, hogy a későbbiekben őket keresőkosként az ivarzők kiválogatására használhassuk. A műtét után a kosok amoxicillin (Betamox LA® A.U.V., Norbrook, UK) injekciót kaptak, 1 ml vagy 15 mg/10 ttkg adagban. Az anyajuhok és a keresőkosok a program előkészítése, és a kísérletsorozat ideje (2009. februártól 2010. ápriliséig) alatt folyamatos állategészségügyi kontroll alatt álltak, egészségi állapotukat, kondíciójukat folyamatosan, mintegy 10 naponta monitoroztuk. Az állatok kiválasztása után 1 hónapos különbséggel kétszer vettünk vért a v. jugularisból a csoport minden egyedétől a következő betegségek monitorozása céljából: brucellózis, klamidiózis, Q-láz, maedi-visna, leptospirozis, listeriózis. A programot megelőzően minden egyed, - az anyajuhok és a keresőkosok is - a telephelyen megszokott féreghajtási protokollban részesültek, de mivel vakcinát a telep nem alkalmaz az állománynál, a kezelést kiegészítettük Enzovax® (MSD Animal Health, France) Chlamydia abortus elleni aktív immunizálással.

A Kft. az állatokat a hazai üzemi körülményeket reprezentáló módon tartotta és takarmányozta. Az állatokat hodályban tartották (zárt, mélyalmos tartás), amelyhez önálló kifutó tartozott, elkülönítve az állomány kísérletben nem résztvevő egyedétől.

A széna etetésére a hodályban mobil szénaetető rácsot alkalmaztak, míg az abraktakarmányt abrakos vályúból etették, a vizet itatóvályúból itatták. A rétiszéna és a víz ad libitum állt az állatok rendelkezésére, míg az abraktakarmány (gazdasági abrakkeverék) fejenkénti adagja 0,4 kg volt anyajuhonként. Fontos megjegyezni, hogy a hodály azon részén, ahol az anyajuhokat elhelyezték, rendelkezésünkre állt két egymástól elválasztott, kb. 60-60 m² -es választó rácsokkal lerekesztett rész (1. kép), ahol meg tudtuk oldani az állatok elhelyezését az éheztetés idejére (ld. később).



1. kép: mesterséges termékenyítésre várakozó donor anyajuhok

A 4 db keresőkost a hodály másik oldalán, a tenyészkosok mellett, de azoktól elkülönítve helyezték el. A programra való állategészségügyi előkészítésük és takarmányozásuk/tartásuk megegyezett a recipiens anyajuhokéval. A vasectomia után 10 nappal varratszedést végeztünk, majd a műtétet követő kb. 1 hónap elteltével elektroejakulátor segítségével spermát vettünk a keresőkosoktól, hogy a műtét 100%-os hatékonyságát ellenőrizzük.

3.5. Az embrióátültető program és a műtétek elvégzésének helye

Természetesen a Szűcs-Juh Kft. nem rendelkezett olyan helyiségekkel a juhtelepen, ahol egy ET program megfelelő higiénia és körülmények között végrehajtható lett volna. Ezért az első programot megelőzően, 2008. tavaszán a hodály egyik részének átalakításába kezdtek, hogy a műtétekhez és az embrió manipulációhoz megfelelő előkészítő, műtő, és laboratóriumi helyiségeket alakítsanak ki. Egy körülbelül 60 m²-es, hodály melletti, de azzal összeköttetésben levő téglapépület fűtés és vízrendszerét átalakították, a helyiségeket kimeszelték és kicsempézték. Összesen 3 helyiség kialakítására került sor az épületen belül:

1. *előkészítő és műtét utáni utóvárokozttató/őrző*: itt az állatok bódítását, nyírását, borotválását, vérvételt, és a speciálisan erre a célra kialakított műtőkocsira (ld. később) való felhelyezést és rögzítést végeztük.
2. *műtőhelyiség*: a műtési terület további előkészítése (fertőtlenítés, izoláció), mesterséges termékenyítés, embriókinyerés, embrióátültetés, sebészi beavatkozás utáni utókezelés történt itt.
3. *embriológiai laboratórium*: a vérminták tárolásának, embrióbírálat, embriók beültetésre történő előkészítésének, sperma termékenyítésre való előkészítésének helye.

3.6. Az embrióátültető programok végrehajtása

A két éves vizsgálatsorozatunk alatt 2-2, tehát összesen 4 EÁ programot indítottunk: 2009. februárban (szezonon belül), 2009. áprilisban (szezonon kívül), 2010. februárban (szezonon belül) és 2010. áprilisban (szezonon kívül). 2009. februárjában összesen 16, 7 donor és 9 recipiens magyar merinó anyajuhot vontunk a kísérletbe, 2009. áprilisban pedig 6 donorral és 10 recipiennel dolgoztunk (összesen szintén 16 állat). 2010. februárban 6 donor és 14 recipiens, 2010. áprilisban 6 donor és 13 recipiens vett részt a programokban. A két év alatt tehát összesen 71 állatot szerepeltettünk a kísérletsorozatban.

Minden program előtt azonos módon végeztük a donor, illetve a recipiens állatok előkészítését, a ciklust/ovulációt a biológiai tenyész-szezonban, valamint a tavaszi acikliás időszakban azonos módszerrel indukáltuk/szinkronizáltuk, és évszakonként megegyezett a többszörös ovuláció (szuperovuláció) kiváltásának, valamint az ovariális válaszkészség nyomon követésének a módja is (részleteiben ld. 1. táblázat).

1. táblázat: A **donor** és **recipiens** anyajuhokban alkalmazott kezelési (szuperovuláció, ivarzás-szinkronizálás) és mintagyűjtési protokoll

Kezelési nap	Időpont	Beavatkozás	
		Donorok	Recipienssek
1	Reggel 8 h	Gesztagén-forrás ¹ behelyezése	
12	Reggel 8 h	FSH kezelés ²	---
	Este 8 h	FSH kezelés ²	---
13	Reggel 8 h	FSH kezelés ²	---
	Este 8 h	FSH kezelés ²	---
14	Reggel 8 h	FSH kezelés ²	Gesztagén-forrás eltávolítása + eCG ³
	Este 8 h	FSH kezelés ² + gesztagén-forrás eltávolítása	---
15-16-17	Reggel/este	Mesterséges termékenyítés előtt 36 óra teljes táplálékmegvonás	Ivarzásmegfigyelés ⁴
16	Reggel 8 h	Mesterséges termékenyítés (laparoszkópiás) + GnRH ⁵ Ezt követően: fedeztetés ⁶	Ivarzásmegfigyelés ⁴
		Vérminták gyűjtése metabolikus és hormonális vizsgálatokra (továbbiakban: D0 minta)	
19	Reggel 8 h	Vérminták gyűjtése metabolikus és hormonális vizsgálatokra (továbbiakban: D2 minta), majd 36 óra teljes táplálékmegvonás	
21	Reggel 8 h	Embriókinyerés (sebészi) ⁷	Embrióbeültetés (sebészi) ⁷
		(a) Vérminták gyűjtése metabolikus és hormonális vizsgálatokra (továbbiakban: D3 minta) (b) A képződött sárgatestek (CL) megszámlálása, morfológiai tulajdonságaik (nagyság, szín) pontozása (c) A testtömeg és a tápláltsági állapot meghatározása	

¹ 20 mg Cronolon (szin.: Fluorogeston; Chronogest CR hüvelyszivacs, MSD Animal Health, France).

² FSH (Ovagen® inj. A.U.V., Immuno Chemical Products Ltd, New Zealand).

³ 500 NE vemhes kanca szérumsz. gonadotropin (eCG, korábbi szin.: PMSG; Folligon inj, MSD Animal Health, France).

⁴ Vasectomizált kereső kosokkal.

⁵ 50 µg Buserelin acetát (Receptal inj., MSD Animal Health, France).

⁶ Tenyészkosoknak a donorok közé helyezésével a MT után(háremeztetés; kosonként 4 anyajuh).

⁷ A 36 órás teljes táplálékmegvonást követően.

A programra való előkészítésnél az **1. kezelési napon** mind a 4 esetben a gesztagén forrásnak (CHRONO GEST® CR hüvelyszivacs, MSD Animal Health, France) az anyajuhokba történő behelyezésével kezdődött a kezelési protokoll. A **12. kezelési napon** kezdődött a donor állatok szuperovulációs hormonkezelése FSH-val (Ovagen® inj. A.U.V., Immuno Chemical Products Ltd, New Zealand) naponta két időpontban, reggel 8 és este 20 órakor 3 napon keresztül. Ettől kezdve a donor és recipiens anyajuhokat egy ráccsal elrekesztve, 2 külön részben helyezték el, a munka egyszerűsítése és az állatok biztosabb azonosíthatósága miatt. Az utolsó FSH injekcióval egy időben, a **14. kezelési napon** este eltávolítottuk a donorokból a hüvelyszivacsot. A recipiensekből a hüvelyszivacsot 12 órával korábban, a **14. kezelési nap** reggelén vettük ki, mellyel egyidejűleg 500 NE PMSG (Folligon® A.U.V. inj., MSD Animal Health, France) injekciót kaptak az állatok intramuszkulárisan (i.m., izomba).

A **15-17. kezelési napokon** a recipiensek közé naponta háromszor, reggel, délben és este engedték be a vazektomizált charollais kereső kosokat az ivarzők kiválogatása céljából. Amint a kos ivarző anyajuhot talált, annak az egyednek a fülszáma azonnal feljegyzésre került azzal együtt, hogy pontosan hány óra hány perckor "állt meg a kosnak". A donorok mesterséges termékenyítését (részletes leírást ld. később) a **16. kezelési nap** reggelén végeztük, és a műtétet kb. 36 órás koplaltatás előzte meg, a már korábban vázolt külön erre a célra lerekesztett helyen. Sajnos az állatok takarmány és ivóvízmegvonása elkerülhetetlen a beavatkozás előtt, melynek oka egyrészt műtéttechnikai: mind a laparoszkópos, mind a sebészi/félsébészi módszer előtt fontos, hogy a bendő üres legyen, és ne zavarja az operatőrt a munkában, másrészt pedig, mivel az állat a speciális műtőasztalon kb. 30-45°-os dőlésszögben helyezkedik el fejjel lefelé, ha nem lennének üresek az előgyomrok (legalább részben) nagyon nagy lenne a regurgitáció és a következményes félrenyelés/fulladás veszélye. Természetesen 36 órás koplaltatással egy kérdéses emésztőtraktusát nem lehet kiüríteni, de csökkenthetjük a fent említett nehezítő és rizikófaktorokat. A mesterséges termékenyítés után a donorok 0,8 ml/0,00336 mg GnRH (Receptal® inj. A.U.V., MSD Animal Health, France)-t kaptak i.m., majd az eredeti tartási helyükön azonnal friss ivóvíz és takarmány várta őket. A mesterséges termékenyítés napján, tehát a 16. kezelési napon gyűjtöttük az első vérmintákat metabolikus és hormonális vizsgálatokra (D0 minta), mind a donoroktól,

mind a recipiensektől. A donorok csoportjába a 16. napon a mesterséges termékenyítés után kb. 2-3 órával egy ún. „színjelző” kost helyeztünk, hogy adatokat gyűjtsünk azzal kapcsolatban, hogy a szuperovuláció eredményeként létrejött petesejtek közül mennyi termékenyült a termékenyítésből és mennyi a természetes fedezetéből. A „színjelző” kos használata azt jelenti, hogy a fehér színű dorper kostól (spermadonor) merőben eltérő színű Barbados Black Belly fajtájú kost engedtünk az anyajuhok közé, így a születendő bárányokról egyértelműen eldönthető volt, hogy a mesterséges termékenyítés vagy a természetes pároztatás eredményeként születtek meg.

A **19. kezelési napon** újabb vérmintagyűjtés (D2 minta) következett, és ezt követően indult az embriókinyerés és az átültetés előtti újabb 36 órás takarmány és ivóvíz megvonás a donorok és a recipiensek csoportjában egyaránt. A műtétekre a **21. kezelési napon** került sor. A reggeli órákban (8 és 9 óra között) kezdtük az embrió kinyeréseket, majd a reakció minőségétől függően 1-2 donor után a kinyert embriók beültetése következett. Ugyancsak a 21. napon, az embriókinyerés- és átültetés napján, tehát a víz és takarmánymegvonás végén került sor a 3. vérvételre (D3 minta) is a donoroktól és recipiensektől egyaránt.

3.6.1. A vérmintagyűjtés

A vérmintákat a donor és a recipiens egyedektől mind három alkalommal, mind a 4 program esetében azonos protokoll szerint gyűjtöttük. Kiskérődzők esetében a v. jugularisból való vérvétel a legpraktikusabb és leggyorsabban kivitelezhető. Állatonként és alkalmanként 20-20 ml vér levételére került sor, alvadásgátlóként nátrium etiléndiamin-tetraecetsavat (Na-EDTA) tartalmazó csövekbe. A mintákat 2 órán belül centrifugáltuk, a plazmát azonnal egy-másfél ml-enként kis műanyag tárolócsövekbe – Eppendorf cső (EPPENDORF, Austria) – fejtettük át (kb. 6-7 cső/vérminta). Minden csőre vízálló filctollal ráírtuk a kísérlet betűjelét (azaz D = donor állattól származik a vérminta vagy R = recipiens állattól származik a vérminta), az állat azonosító számát, továbbá a minta jelét (D0, D2 vagy D3). Az alkalmanként 6-7 tárolócsövet mintánként egy-egy kis műanyag zacskóba csomagoltuk; az egy állattól származó mintákat gyűjtőcsomagba helyeztük, amelyben egy papírlapon feltüntettük a kísérlet betűjelét és az állat számát. A mintákat az analízisig (SZIE-ÁOTK Endokrinológiai Laboratóriumba szállításig) -18 °C-on tároltuk (szállítás közben is fagyasztottuk).

Donor anyajuhok esetében a következő 3 alkalommal gyűjtöttünk vérmintákat: a *termékenyítés* időpontjában (továbbiakban: **D0 minta**), a 36 órás takarmánymegvonás kezdetén (továbbiakban: **D2 minta**), valamint az *embriónyerés* időpontjában (továbbiakban: **D3 minta**).

Recipiens anyajuhok esetében a következő 3 alkalommal gyűjtöttünk vérmintát: az *ivarzás feltételezett időpontjában* (azaz a gesztagenkezelés kezdete utáni 16. napon; a továbbiakban: **D0 minta**), a 36 órás takarmánymegvonás kezdetén (továbbiakban: **D2 minta**), valamint az *embrióbeültetés* időpontjában (továbbiakban: **D3 minta**).

A vizsgált vérparaméterek élettani határértékeit GAÁL, 1999 és RADOSTITS, 2007 alapján határoztuk meg.

Az egyes vérparaméterek vizsgálati módszerei a következők voltak:

BHB: SACKS, 1999 módszere alapján, BioSystems A-25 klinikai-kémiai készülékkel (BioSystems SA, Spain).

NEFA: NOMA és mtsai, 1973 leírása után, Unicam Helios Gamma fotometer segítségével (Unicam Ltd., UK).

TP: JOSEPHSSON és GYLLENSWARD, 1957 módszere alapján, BioSystems A-25 klinikai-kémiai készülékkel (BioSystems SA, Spain).

Karbamid: TIETZ, 1987 után, BioSystems A-25 klinikai-kémiai készülékkel (BioSystems SA, Spain).

Koleszterol: RÖSCHLAU és mtsai, 1974 után, BioSystems A-25 klinikai-kémiai készülékkel (BioSystems SA, Spain).

AST/ GOT: BERGMAYER és mtsai, 1976 leírása alapján, BioSystems A-25 klinikai-kémiai készülékkel (BioSystems SA, Spain).

P4: AxSYM Progesterone, Microparticle Enzyme Immunoassay (MEIA) felhasználásával (Abbott, AxSYM System, 2004, Abbott, Japan)

IGF-1 és inzulin: ¹²⁵I-jelzett radioimmunometrikus sandwich assay kit (BI-Insulin IRMA kit; CIS Bio International Ltd – Subsidiary of Schering S.A., Gif-Sur-Yvette, France)

T4: ¹²⁵I-T₄ coted-spec.-RIA kit segítségével (Institute of Isotopes Co. Ltd. Budapest, Hungary)

T3: ¹²⁵I-T₃ RIA MIS kit segítségével (Institute of Isotopes Co. Ltd. Budapest, Hungary)

3.6.2. A mesterséges termékenyítés (MT)

A MT-t laparoszópos technikával végeztük a donoroknál. A termékenyítéshez a Debreceni Egyetem (DE) Mezőgazdaság-, Élelmiszertudományi és Környezetgazdálkodási Kar Kísérleti Telepéről (Debrecen-Kismacs) származó donor fehér dorper fajtájú kos spermáját használtuk fel. A spermavételre a Kísérleti Telepen, mindig a MT napjának reggelén került sor. A spermát mindig ugyanaz a gondozó gyűjtötte, a „fedező partner” nem ivarzó anyajuh volt. Az ondót műhüvelybe gyűjtöttük. Az ejakulációt követően a frissen gyűjtött ondót azonnal értékeltük, meghatároztuk a térfogatot, a spermiumok sűrűségét, az ondósejtek mozgást, a motilis spermiumok arányát. Csak azt a termékenyítőanyagot fogadtuk el MT-re alkalmasnak, amely a tömegmozgást értékelő rendszer (SALAMON, 1976) szerint nagyon jó, vagy jó minősítést kapott. Ezután következett az ejakulátum 38°C-ra felmelegített Tris-hígítóval (Tris: /hidroximetil-aminometan/: 3,63 g, fruktose: 0,50 g, acid citrici: 1,99 g, kétszer desztillált víz ad 100 ml, glicerin: 5 ml, tojássárgája: 15 ml) való hígítása egy lépésben (OLÁH, 2010). Az alapoldathoz mindig aznap, frissen kevertük a glicerint és a tojássárgáját. A hígított ondót ezután termoszban szállítottuk Mikepércsre, a felhasználás helyszínére.

Minden műtéti beavatkozás előtt (így a MT, embriókinyerés, EÁ) ugyanolyan protokoll szerint készítettük elő az állatokat.

A műtetre kiválasztott egyedeket két gondozó az előkészítő helyiségbe (ld. korábban) hozta, ahol az altatást 1 ml/10 ttkg acepromazin i.m. (Vetranquil® 1% A.U.V. inj., Ceva-Phylaxia, France) és 0,05-0,1 mg/ttkg xylazin i.m. (Xylavet® A.U.V. inj., Ceva-Phylaxia, France) kombinációjával végeztük. A bódulat beálltának kezdete után az állatot felhelyezték a speciálisan erre a célra kialakított műtőskocsira, ahol a műtéti terület előkészítése kezdődött el: a tőgy fölötti kb 20x20 cm-es területet lenyírták, majd megtisztították fertőtlenítő szappannal, és leborotvtálták.

A műtőasztal/műtőskocsi kerekeken guruló, fém kocsi, amely 45°-os szögben dönthető, és amelyen az állat fejével lefelé rögzíthető. A kocsi speciális kialakítása azért fontos, mert így az állat hasüregi szervei a rekesz felé csúsznak, szabaddá téve ezzel a medenceüregben elhelyezkedő méhet és petefészkeket. Még az előkészítő helyiségben 1 ml/10 ttkg adagban amoxicillin (Betamox LA® A.U.V. inj., Norbrook, UK) és tolfenaminsav 1 ml/10 ttkg (Tolfedine 4% inj. A.U.V., Vétoquinol S.A., Canada) injekciókat kapott. Az állat ezután átkerült a műtő helyiségbe. Itt fertőtlenítettük a

műtéti területet Betadinnal (Egis, Hungary), és a metszés helyét (5-10 ml a vágás nagyságától függően) procain-hidrokloriddal (Minocain 2% A.U.V., Atarost GmbH, Germany) érzéstelenítettük, majd egy izoláló fóliát helyeztünk az állat hasára, amelyet csipeszek segítségével rögzítettünk. Az altatás hatékonyságát folyamatosan ellenőriztük, és ha szükséges volt, az eredeti adag kb. negyedével „ráaltattunk” az anyajuhokra. Tapasztalataink szerint a juhok altatása rizikós és egyedfüggő feladat, ezért az altatószerek használati utasításán szereplő dózisoknak az előkészítés alatt csak mintegy felét-háromnegyedét injekcióztuk be, és ha szükségessé vált, csak akkor kapta meg az állat a maradékot. Mesterséges termékenyítésnél elegendő csak a felületes bódítás, de mosás és ültetés végrehajtásánál mindig mélyebben kell altatnunk az állatokat.

A laparoskopos MT kivitelezése a következőképpen zajlott le (laparoskop és egyéb műszerek- Storz, Germany; EMD Hungary): a tőgy előtt kb. 10 cm-re, és a középvonaltól szintén ilyen távolságban két, egyenként kb. 3 cm-es bőrmetszést ejtettünk egy szikével a hasfal bőrén. Mindkét seben keresztül egy erőteljes és határozott mozdulattal (vigyázva, hogy belső szervet semmiképp ne érjünk el) egy-egy trokárt vezetünk a hasüregbe. Az egyik trokáron keresztül CO₂ gázt áramoltattunk a hasüregbe (kb. 2-3 l/perc áramlási sebességgel az inszufflátor segítségével az azon található biztonsági kapcsoló alkalmazásával, ami automatikusan leállítja a gáz áramoltatását, ha a hasüregben levő nyomás meghalad egy bizonyos, általunk beállított értéket). Így állítottuk elő a pneumoperitoneumot (2. kép). A trokáron keresztül ezután bevezettük az endoszkópot (Storz, Germany). A jobb és bal oldali petefészek, és a méh/méhszarak felkeresése után a másik trokáron keresztül bevezettük a speciál inszemináló eszközt/katétert (IMV Technologies, France), majd először az egyik, utána a másik méhszár megiszúrásával bejuttattuk a termékenyítőanyagot a méhszár hegyébe (3. kép). A laparoskopos termékenyítéskor 0,25-0,25 ml spermát juttattunk mindkét méhszárba. A laparoskopos MT-nél nem szükséges a hasfalsebet zárni, kutatócsoportunk elegendőnek tartja a bőrréteg varrását 1-1 csomós varrattal mindkét oldalon.



2. kép: CO₂ gáz beáramoltatása a hasüregbe



3. kép: mesterséges termékenyítés

3.6.3. Az embriókinyerés

A kísérleteink során minden donor esetében ún. sebési embriókinyerést alkalmaztunk (CSEH és mtsai, 1986). A donor előkészítése megegyezett a MT-nél leírtakkal. A hasfalán a középvonaltól 1 cm-re paramedián a tőgy előtt kb. 10 cm-re egy kb. 8 cm hosszú sebet ejtettünk. Egyik kezünket a hasüregbe csúsztatva előhúztuk a méhet, és óvatosan kiemeltük a jobb, majd bal oldali petefészket. Ellenőriztük a jobb és bal oldali petefészken a képleteket, pl. a képződött sárgatesteket (CL = Corpus Luteum), cisztákat, stb., megszámoltuk őket és feljegyeztük a morfológiai tulajdonságaikat (pl. nagyság, szín, stb.). A hasüregen kívül rögzített méhszarv méhtest felőli végét egy atraumatikus fogóval lezártuk (a folyadék visszafolyását megakadályozandó), majd a petefészek felől a petevezetőbe egy katétert helyeztünk, amelyet szintén rögzíteni szükséges egy atraumatikus fogóval (4. kép). A méhszarv közepén egy tompa hegyű tűvel lyukat ejtettünk, majd kb. 5 ml-enként 3-5 alkalommal megismételve PBS és borjú savó tartalmú mosófolyadékot (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline with 2% Fetal Bovine Serum, Stemcell Technologies, Hungary) fecskendeztünk a méhszarvba, amelyet ezután a petevezető felé történő óvatos masszálással felfogtunk egy lombikban, amelyet előzőleg a petevezetőbe helyezett katéter alá tartottunk (5. kép). A műveletet mind a két méhszarvon megismételtük. Az öblítőfolyadék ezután a laboratóriumba került, ahol

megkezdődött az embriók összegyűjtése, morfológiai tulajdonságaik és átültetésre való alkalmasságuk értékelése. Az embriógyűjtés végeztével a méhet óvatosan visszahelyeztük a hasüregbe, majd kevés Salsol infúziót (Salsol oldatos infúzió, 1000 ml, TEVA, Israel) spriccelünk egy fecskendőn keresztül a belső szervekre, hogy megakadályozzuk az összenövéseket és letapadásokat. A hasfal zárása három rétegben történt (hashártya+izmok, bőr alatti kötőszövet, bőr). A sebet végül oxitetraciklin tartalmú (Oxycort spray, 55 ml, Tarchomin Pharmaceutical Works Polfa S.A., Poland) spray-vel lefújtuk.



4. kép: az EÁ eszközei



5. kép: embriómosás

3.6.4. Az embrióátültetés (EÁ)

Az embrióátültetésnél a recipiensek előkészítése megegyezett az előzőekben leírtakkal. A hasfalon a középvonaltól 1 cm-re paramedián a tőgy előtt kb. 10 cm-re egy kb. 8 cm hosszú sebet ejtettünk. Egyik kezünket a hasüregbe csúsztatva előhúztuk a méhet, és óvatosan kiemeltük a jobb, majd bal oldali petefészket. Megszámoltuk a jobb és bal oldali petefészken képződött sárgatesteket (CL = Corpus Luteum), pontosítottuk morfológiai tulajdonságaikat (nagyság, szín). Az embrióátültetés helye az a méhszarv, amelyiknek az oldalán megfelelő nagyságú (és feltételezhetően működésű) sárgatestet/sárgatesteket találtunk. A kiválasztott méhszarv közepén, egy tompa végű szondával óvatosan lyukat készítettünk, amely az endometriumot is átfúrja (6. kép).

A beültetendő embriókat előzetesen a laboratóriumban előkészítettük, és felszívtuk egy speciális fecskendőbe, amelyet a szondával készített lyukon keresztül a méh lumenébe juttattuk (7. kép). Az EÁ után a méhet óvatosan visszahelyeztük a hasüregbe, majd kevés Salsol infúziót (Salsol oldatos infúzió, 1000 ml, TEVA, Israel) spriccelünk egy fecskendőn keresztül a belső szervekre, hogy megakadályozzuk az összenövéseket és letapadásokat. A hasfal zárása három rétegben történt (hashártya+izmok, bőr alatti kötőszövet, bőr). A sebet végül oxitetraciklin tartalmú (Oxycort spray, 55 ml, Tarchomin Pharmaceutical Works Polfa S.A., Poland) spray-vel lefedtük.



6. kép: a méhfal átszúrása



7. kép: az embriók méh lumenébe juttatása

Minden program előtt meghatározott számú recipiens állt rendelkezésünkre (9-14), és mivel az embriók lefagyasztása nem volt a jelen kutatómunka célja, a recipiensekbe ültetett embriószám mindig a donor állatokból kinyert embriók számától függött. Így volt olyan recipiens állat, amelyik 2, és volt, amelyik 4 beültetett embriórt kapott, az EÁ eredményességét befolyásoló metabolikus hormonok vizsgálata szempontjából csak az volt az érdekes, hogy vemhesül-e az állat, vagy nem.

3.7. A vizsgálatok során alkalmazott statisztikai módszerek

Az adatok leíró statisztikai értékelését a Microsoft Office Excel 2003 program segítségével végeztük el. A metabolikus hormonok és paraméterek eredményeit összefüggésvizsgálatokkal, a szezon és szezonon kívüli időszak összehasonlítását pedig T-próbával végeztük el, az SPSS for Windows 13.0 (SPSS Inc. Chicago, IL.) programmal.

4. Eredmények

4.1. Az embrióátültetési programok eredményeinek bemutatása

4.1.1. 2009. február, tenyészszezonban végzett EÁ program

Az első embriókinyerési és átültetési programra 2009. január 30. és 2009. február 20. között került sor. Az első programba 7 donor és 9 recipiens magyar merinó anyajuhot vontunk be. A kezelési és mintavételi protokoll részleteit, valamint a mesterséges termékenyítést, az embriókinyerést és átültetést az „Anyag és módszer” fejezetben leírtakkal megegyezően végeztük el.

Az embriókinyerés eredményeit a 2. táblázatban foglaltam össze:

2. táblázat: A donor anyajuhok embriókinyerési eredményei a 2009. februári programban

Donor	Sárgatest (db)		Kinyert embrió (db)/ beültetésre alkalmas embrió (db)
	Jobb petefészek	Bal petefészek	
1.	0	0	0/0
2.	0	0	0/0
3.	7	9	20/18
4.	1	3	3/2
5.	2	4	4/4
6.	9	11	13/13
7.	10	7	16/16

Már az első program eredményeiből nyilvánvalóvá vált, hogy a donorok az azonos fajta, tartás, takarmányozás, életkor és kezelési protokoll ellenére mennyire eltérően reagáltak a szuperovulációs kezelésre. Az anyajuhok közül 2 nem reagált a szuperovulációs kezelésre (28,5%), 2 állat gyenge (28,5%), míg 3 rekord embriótermelést produkált (43%).

A 2009-es februári program recipiens anyajuhainak embriátültetési adatait a 3. táblázatban szemléltetem:

3. táblázat: A recipiens anyajuhok embrióátültetési adatai, 2009. február

Recipiens	Sárgatest (db)		Donor / beültetett embrió (db)
	Jobb petefészek	Bal petefészek	
1.	2	0	4/2
2.	2	0	3/3
3.	0	2	3/4
4.	0	1	3/4
5.	1	0	3/3
6.	0	0	-
7.	0	2	6/4
8.	2	0	5/2
9.	2	0	6/3

A recipiensek közül a 6-os anyajuh nem mutatott ivarzási tüneteket a vasectomizált kossal történő kerestetés során, amelyet a petefészek feltárással is megerősítettünk, ezért természetesen nem kapott embriót az állat. Mint azt már a fentiekben is említettem, a programra kiválasztott recipiensek között szétosztottuk az összes, aznap kinyert embriót, hiszen a célunk az volt, hogy vemhesüljön a recipiens, nem volt a kutatás célja az embriók fagyasztása.

2009. március végén, a program befejezése után kb. 40 nappal, elvégeztük mind a donor, mind a recipiens állatok abdominális ultrahangos vemhességvizsgálatát. A donor állatok esetében azért volt ez fontos, hogy ellenőrizzük saját embriókinyerési eredményességünket, recipiensek esetében pedig a kb. 30. vemhességi nap környékére időzített ultrahangos vemhességvizsgálat jól előrevetíti a program eredményességét.

(Az EÁ programok során a beültetett embriók nem mindegyike ágyazódik be, a termékenyített állatok nem 100%-ban vemhesülnek és az embriókinyerés során nem mindig sikerül az összes embriót kinyerni. Ez utóbbi miatt nagyon sok állatorvos, különösen a szarvasmarha donorok esetében, a nagy értékű donort prosztaglandinnal kezeli az embrió kinyerés után, hogy megakadályozza a donor tehén nem kívánt vemhesülését. Esetünkben, a telep kérésére és a minél több bárány megszületése

érdekében eltekintettünk a donorok prosztaglandinnal való kezelésétől, ezért előfordult, hogy a donor anyajuh az embriókinyerés után vemhes maradt.)

A 2009. februári EÁ program vemhességvizsgálati és ellési eredményeit a 4. táblázatban foglalom össze:

4. táblázat: A 2009. februári EÁ program vemhességvizsgálati és ellési eredményei

Kísérleti állatok D= donor, R= recipiens	Vemhességi vizsgálat eredménye	Ellés ideje	Bárányok száma/színe
D1	üres	-	-
D2	üres	-	-
D3	üres	-	-
D4	üres	-	-
D5	vemhes	2009. 07. 11.	2/2 foltos
D6	vemhes	2009. 07. 10.	2/2 fehér
D7	üres	-	-
R1	vemhes	-	-
R2	vemhes	2009. 07. 10.	2/1 foltos, 1 fehér
R3	vemhes	2009. 07. 11.	2/2 foltos
R4	vemhes	2009. 07. 11.	4/2 foltos, 2 fehér
R5	vemhes	2009. 07. 10.	3/3 foltos
R6	üres	-	-
R7	üres	-	-
R8	üres	--	-
R9	üres	2009. 07. 11.	1/1 foltos

* foltos bárány: a Barbados Black Belly színjelző kostól született

fehér bárány: a mesterséges termékenyítésből, fehér dorper kos spermájának felhasználásával fogant

A donorok MT-ét követő 40. nap környékén elvégzett ultrahangos vemhességvizsgálat eredménye szerint tehát a 7 donorból 2 vemhes maradt (28,5%), a recipiensek közül pedig a 9 (8 valóban recipiensként használt) állatból 5 vemhesült (62,5%).

A vemhességi idő végén, 2009. július 10-én, és 11-én ellettek az anyajuhok (ld. 4. táblázat), ahol már az is megfigyelhető volt, hogy a MT (fehér dorper sperma) vagy a természetes fedezés („színjelző” Barbados Black Belly kos /ld. korábban/) volt-e eredményesebb.

A donorok esetében egyeztek az ultrahangos vemhesség vizsgálati és az ellési eredmények, a 7 donor közül 2 ellett (28,5%). A recipiensek esetében a 9 állatból 4 vemhességénél (2, 3, 4, 5) egyezett az ultrahangos és az ellési eredmény. A 9-es recipiens anyajuh is leellett, holott vemhességet ultrahanggal nem tudtunk diagnosztizálni (a hibás negatív eredmény oka lehet pl.: a belek teltsége a vizsgálat idején), míg az 1-es recipiens állat nem ellett a pozitív ultrahangos vemhességi lelet ellenére (a hibás pozitív lelet legvalószínűbb oka a korai magzatfelszívódás, amely juh fajban gyakori jelenség). Összességében a 9 (valójában 8 beültetett) recipiensből 5 ellett (62,5%).

A recipiensek esetében, beültetett embrióra és az abból megszületett bárányok számára vetítve az eredményeket, összesen 25 embriót ültettünk be 8 recipiensbe, amelyből 12 bárány született, tehát a beültetett embriók 48%-a született meg.

A MT és a természetes pároztatás eredményességét összehasonlítva az összesen 16 bárány közül 11 (68%) foltos volt (a Barbados Black Belly színjelző kóstól született), míg 5 (32%) fehér (MT fehér dorper spermával).

4.1.2. 2009. április, szezonon kívüli időszak

A második (és egyben az első szezonon kívüli) embriókinyerési és átültetési programra 2009. április 1. és 2009. április 20. között került sor. Ebbe a programba 6 donor és 10 recipiens magyar merinó anyajuhot vontunk be. A kezelési és mintavételi protokoll részleteit, valamint a mesterséges termékenyítést, az embriókinyerést és átültetést az „Anyag és módszer” fejezetben leírtakkal megegyezően végeztük.

Az embriókinyerés eredményeit az 5. táblázatban szemléltetem:

5. táblázat: A donor anyajuhok embriókinyerési eredményei a 2009. áprilisi programban

Donor	Sárgatest (db)		Kinyert embrió (db)/ beültetésre alkalmas embrió (db)
	Jobb petefészek	Bal petefészek	
1.	6	3	6/1
2.	0	0	0
3.	4	1	1/0
4.	1	3	2/0
5.	2	4	5/5 (2 sejtes)
6.	9	11	0

Az első szezonon kívüli program embriókinyerési eredményei a vártnál sokkal rosszabbak lettek. A petefészkeken levő CL-ok megszámlálása során azt gondoltuk, hogy az állatok nagy része megfelelő válaszreakciót adott a szuperovulációs kezelésre, de hamar kiderült, hogy ez nem így van, és mindössze 1 jó minőségű embriót nyertünk a 6 donor anyajuhától. Az 5-ös donortól 5 két sejtes embriót sikerült kimosni, amelyeket beültettünk ugyan a recipiensekbe, de fejlődésbeli elmaradottságuk miatt eredményt már az ültetéskor sem reméltünk. Összességében azt mondhatjuk, hogy a 2009. áprilisi EÁ programban a donorok 100%-a szinte nulla embriótermeléssel válaszolt a szuperovulációs kezelésre, és a kinyert képletek száma és azok minősége elmaradt a várakozástól.

Az előkészített recipiensek mindegyike - kivétel nélkül - mutatott ivarzási tüneteket a vasectomizált kossal történő kerestetés során, és közülük kettőbe ültettük be az összesen 6, megkérdőjelezhető minőségű embriót (ld. 6. táblázat). A maradék 8 recipienst természetesen nem használtuk fel.

6. táblázat: A recipiens anyajuhok embrióátültetési adatai, 2009. április

Recipiens	Sárgatest (db)		Donor/ beültetett embrió (db)
	Jobb petefészek	Bal petefészek	
1.	2	0	1/1; 5/2
2.	2	0	5/3

A második EÁ program utáni kb. 40. napon ismét megtörtént a donorok és recipiensek ultrahangos vemhességvizsgálata, amely a vártnak megfelelően teljesen negatív eredménnyel zárult. Mindezt megerősítette az is, hogy a program után 150 nappal nem született egy bárány sem.

4.1.3. A 2010. februári EÁ program, szezonon belül

A második szezonon belüli EÁ programot 2010. február 7. és február 26. között végeztük el. A programban 6 donor, és 14 recipiens anyajuh vett részt. A kezelési és mintavételi protokoll részleteit, valamint a mesterséges termékenyítést, az embriókinyerést és átültetést az „Anyag és módszer” fejezetben leírtakkal megegyezően végeztük el. A donorok közül egy állat nem mutatott ivarzási tüneteket a vasectomizált kossal történő kerestetés során, és a laparoszkóppal való megtekintés során is látszott, hogy a petefészkek nem reagáltak a kezelésre, ezért nem termékenyítettük ezt a donor anyajuhot.

Az embriókinyerés eredményeit a 7. táblázatban mutatom be:

7. táblázat: A donor anyajuhok embriókinyerési eredményei a 2010. februári programban

Donor	Sárgatest (db)		Kinyert embrió (db)/ beültetésre alkalmas embrió (db)
	Jobb petefészkek	Bal petefészkek	
1.	3	3	8/6
2.	2	2	4/3
3.	2	4	6/4
4.	5	3	5/4
5.	13	4	16/15

A donorok közül egy (6.) valószínűleg elhagyta a hüvelyszivacsot, így kizártuk a műtétéből. A további 5 donor szuperovulációs kezelésre adott válaszreakciója nagyon eltérő, az 5-ből 1 állat gyenge (20%), 3 jó (60%), míg 1 rekord embriótermelést (20%) produkált. A donoronkénti átlagos kinyert embriószám 7,8, a donoronkénti átlagos beültetésre alkalmas embriók száma 6,4, míg az átlagos sárgatestszám 8,2. A 2009-es

szezonon belüli eredményekhez képest, itt nem találunk olyan donor anyajuhot, amelyik nem reagált volna valamilyen formában az FSH kezelésre.

8. táblázat: A 2010. februári program recipiens anyajuhainak ültetési adatai

Recipiens	Sárgatest (db)		Donor/ beültetett embrió (db)
	Jobb petefészek	Bal petefészek	
1.	2	0	5/3
2.	2	0	3/2
3.	0	2	3/2
4.	0	1	5/3
5.	0	1	5/4
6.	0	1	5/2
7.	1	1	5/3
8.	2	0	4/2
9.	2	0	4/2
10.	1	0	2/3
11.	0	2	1/3
12.	1	0	1/3

A 14 recipiens állatból 2 egyed már az előkészítés során kiesett a további beavatkozásokból (13. és 14.). 12 anyajuh megfelelő ivarzási tüneteket mutatott az előkészítés során, és mindezt a petefészkeken levő sárgatestek is megerősítették (ld. 8. táblázat).

A program eredményességéről minél hamarabb meg szeretnénk volna győződni, ezért március végén elvégeztük a donor és recipiens állatok transzabdominális ultrahangos vemhességvizsgálatát, amelynek eredményét a 9. táblázatban mutatom be:

9. táblázat: A 2010. februári program ultrahangos vemhességvizsgálati és ellési eredménye (donor és recipiens)

Kísérleti állatok D= donor, R= recipiens	Vemhességi vizsgálat eredménye	Ellés ideje	Bárányok száma/színe
D1	üres	-	-
D2	üres	-	-
D3	vemhes	-	-
D4	üres	-	-
D5	üres	-	-
R1	vemhes	2010. 07. 16.	1/1 fehér
R2	üres	-	-
R3	vemhes	2010. 07. 16.	1/1 fehér
R4	vemhes	-	-
R5	vemhes	2010. 07. 16.	2/2 fehér
R6	vemhes	-	-
R7	vemhes	2010. 07. 17.	2/2 fehér
R8	vemhes	2010. 07. 16.	1/1 fehér
R9	üres	2010. 07. 17.	1/1 foltos
R10	üres	2010. 07. 17.	2/2 fehér
R11	vemhes	2010. 07. 16.	1/1 fehér
R12	üres	-	-

* foltos bárány: a Barbados Black Belly színjelző kostól született

fehér bárány: a mesterséges termékenyítésből, fehér dorper kos spermájának felhasználásával fogant

A 6 donor közül 1 látszott vemhesnek az ultrahangos vemhességvizsgálat elvégzése után. A recipiensek esetében, a 12 állatból 8 egyed korai vemhességet állapítottunk meg (66%-os vemhesülési arány).

A vemhességi idő végén, 2010. július 16-án, és 17-én ellettek az anyajuhok, ahol ismét megfigyelhettük, hogy a mesterséges termékenyítés (fehér dorper sperma) vagy a „színjelző” Barbados Black Belly kos (ld. korábban) volt-e eredményesebb (ld. 9. táblázat).

A donorok esetében 0% volt a bárányozási arány, nem született báránya annak a 3-as fűlszámú donor állatnak sem, amely korábban az ultrahangos vizsgálatnál vemhesnek bizonyult (korai embriófelszívódás?).

A recipiensek esetében a 12 állatból 6 vemhességénél (1, 3, 5, 7, 8, 11) egyezett az ultrahangos és az ellési eredmény. Az 10-es, és a 9-es fűlszámú recipiens anyajuh is leellett, holott vemhességet ultrahanggal nem tudtunk diagnosztizálni (a fals negatív eredmény oka lehet pl.: a belek teltsége a vizsgálat idején), míg a 6-os, és a 4-es fűlszámú állat nem ellett a pozitív ultrahangos vemhességi lelet ellenére (a fals pozitív lelet legvalószínűbb oka a korai magzatfelszívódás, amely juh fajban gyakori jelenség). A 12 embriót kapott recipiens közül 8 egyed ellett (66,6%).

A recipiensek esetében, beültetett embrióra és az abból megszületett bárányok számára vetítve az eredményeket, összesen 32 embriót ültettünk be 12 recipiensbe, amelyből 11 bárány született, tehát a beültetett embriók 34%-a született meg. A MT és a természetes párosztatás eredményei: a 11 bárányból 10 egyed (91%) fehér, tehát MT-ből fogant, míg 1 (9%) foltos, amely a színjelző kos után született.

4.1.4. A 2010. áprilisi EÁ program, szezonon kívül

A második szezonon kívüli EÁ programot 2010. április 11. és április 30. között végeztük. A programban 6 donor, és 14 recipiens anyajuh vett részt. A kezelési és mintavételi protokoll, valamint a mesterséges termékenyítés, az embriókinyerés és átültetés az „Anyag és módszer” fejezetben leírtakkal azonos volt.

A donor anyajuhok embriókinyerési eredményeit a 10. táblázatban szemléltetem:

10. táblázat: A donor anyajuhok embriókinyerési eredményei a 2010. áprilisi programban

Donor	Sárgatest (db)		Kinyert embrió (db)/ beültetésre alkalmas embrió (db)
	Jobb petefészek	Bal petefészek	
1.	4	5	6/2
2.	4	6	9/9
3.	10	12	17/4
4.	9	5	14/12
5.	7	5	10/7
6.	10	2	10/10

A 6 donor közül 2 jó (33%), míg 4 rekord (67%) embriótermeléssel reagált a szuperovulációs kezelésre. Az átlagos kimosott embriószám donoronként 11, a beültetésre alkalmas embriók száma donoronként 7,3, míg az átlagos sárgatestszám 13,16 volt.

A programra előkészített 13 recipiens közül 12 anyajuh megfelelő ivarzási tüneteket mutatott, de az embrióátültetés napjára mindet előkészítettük. A 13-as fűlszámú anyajuh esetében az állat műtét napján mutatott rossz általános állapota miatt beavatkozásra nem került sor.

A recipiens állatok ültetési eredményeit a 11. táblázatban mutatom be:

11. táblázat: A 2010. áprilisi program recipiens állatainak EÁ adatai

Recipiens	Sárgatest (db)		Donor/ beültetett embrió (db)
	Jobb petefészek	Bal petefészek	
1.	1	0	6/ 3
2.	2	0	6/ 4
3.	0	1	6/ 3
4.	0	2	1/ 2
5.	0	1	4/ 3
6.	2	0	4/ 6
7.	0	1	4/ 3
8.	0	2	5/ 4
9.	1	0	5/ 3
10.	1	1	2/ 4
11.	0	2	2/ 5
12.	2	0	3/ 4
13.	-	-	-

Annak érdekében, hogy a program eredményességéről minél hamarabb meggyőződhesünk, 2010. május végén elvégeztük a donor és recipiens állatok transzabdominális ultrahangos vemhességvizsgálatát, amelynek eredménye a 12. táblázatban tekinthető meg:

12. táblázat: A 2010. áprilisi program ultrahangos vemhességvizsgálati és ellési eredménye (donor és recipiens)

Kísérleti állatok D= donor, R= recipiens	Vemhességi vizsgálat eredménye	Ellés ideje	Bárányok száma/színe
D1	üres	-	-
D2	üres	-	-
D3	üres	-	-
D4	üres	-	-
D5	üres	-	-
D6	vemhes	2010. 09. 02.	2/2 fehér
R1	üres	-	-
R2	vemhes	2010. 09. 04.	1/1 foltos
R3	vemhes	2010. 09. 03.	1/1 foltos
R4	vemhes	2010. 09. 03.	2/2 foltos
R5	vemhes	-	-
R6	üres	-	-
R7	üres	-	-
R8	üres	-	-
R9	vemhes	2010. 09. 03.	2/1 fehér, 1 foltos
R10	vemhes	2010. 09. 03.	1/1 foltos
R11	vemhes	2010. 09. 04.	1/1 fehér
R12	vemhes	2010. 09. 04.	2/2 foltos
R13	üres	-	-

* foltos bárány: a Barbados Black Belly színjelző kostól született

fehér bárány: a mesterséges termékenyítésből, fehér dorper kos spermájának felhasználásával fogant

A transzabdominális ultrahangos vemhességvizsgálat alapján a 6 donor anyajuh közül 1 maradt vemhes (16,6%) az embriókinyerés ellenére, míg a 13 recipiens közül 8 vemhesült (61,5%).

A vemhességi idő végén, 2010. szeptember 2-án, 3-án és 5-én ellettek az anyajuhok, ahol ismét megfigyelhettük, hogy a mesterséges termékenyítés (fehér dorper sperma) vagy a „színjelző” Barbados Black Belly kos (ld. korábban) volt-e eredményesebb (ld. 12. táblázat).

A donorok esetében 16,6% volt a bárányozási arány, a korábban ultrahanggal diagnosztizált 6-os donor anyajuh ellett.

A recipiensek esetében a 13 állatból 8 vemhességét mutattuk ki ultrahanggal, amelyek közül csak az 5-ös anyajuh nem ellett, így a bárányozási arány a recipiensek esetében 13/7, azaz 54%.

A recipiensek esetében, beültetett embrióra és az abból megszületett bárányok számára vetítve az eredményeket, összesen 44 embriót ültettünk be 12 recipiensbe, amelyből 12 bárány született meg, tehát a beültetett embriók 27%-a született meg. A megszületett bárányok közül 4 (33%) fehér színű, tehát esetükben a mesterséges termékenyítés volt eredményes, míg 8 (67%) foltos, tehát a színjelző kos az apa.

4.2. A juh embrió átültetési programok és a takarmányozás kapcsolata

4.2.1. A 2009. és 2010. áprilisi programok donor állataiból vett vérminták anyagforgalmi paramétereinek vizsgálati eredményei I.

A 2010. áprilisi program eredményeinek ismeretében elgondolkodtató volt az egy évvel korábbi (2009. április) program sikertelensége. A 2009-ben, szezonban és szezonon kívül elvégzett programok eredményei után azt gondoltuk, hogy a markáns különbség oka a szezon/szezonon kívüli időszak, illetve az azzal kapcsolatosan mutatkozó hormonális különbségek. Ezt a feltételezésünket arra alapoztuk, hogy a (általunk ellenőrizhető) körülmények és egyéb tényezők megegyeztek a két program esetében, amelyek esetleg eltérést okozhattak volna.

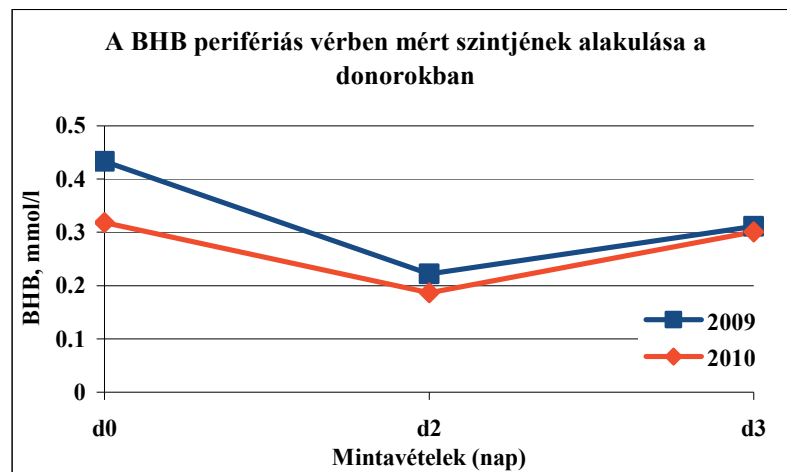
Azonban a 2010. áprilisi program sikere fölülírta ezt az álláspontunkat.

A 2009-es és 2010-es évek azonos időszakában (február és április), azonos állományban, azonos hormonkezelési protokoll és hormonkészítmények alkalmazása mellett a donorok superovulációs válaszciklusában tapasztalt nagy különbség okainak tisztázása érdekében további, előre be nem tervezett vizsgálatokat végeztünk.

Megpróbáltunk utána nézni annak, hogy a nagy különbséget magyarázhatja-e az állatok takarmány-ellátottságában esetlegesen fennálló különbség, anomália (pl. a takarmányozás színvonalában/minőségében, az állatok tápanyag ellátottságában esetleg fennálló különbség a jelenség magyarázata). Az említettek tisztázása céljából a 2009. és a 2010. áprilisi kísérletekben részt vett donor állatok vérmintáiból - utólag - olyan anyagforgalmi vérparaméterek szintjét határoztuk meg, amelyek jól jelzik az állatok metabolikus aktivitását, tápanyag ellátottságának minőségét. Azt feltételeztük, hogy az egymást követő két évben, az év azonos időszakában vett vérmintákban a metabolikus paraméterek szintjében különbséget kell találnunk. A következő metabolikus paraméterek plazma szintjét vizsgáltuk: béta-hidroxi-vajsav (BHB), nem észterifikált zsírsavak (NEFA), koleszterol, karbamid, aszpartát-aminotranszferáz (AST/GOT) és összfehérje (TP). A paraméterek meghatározásának részletes protokolljait az „Anyag és módszer” fejezetben ismertetem.

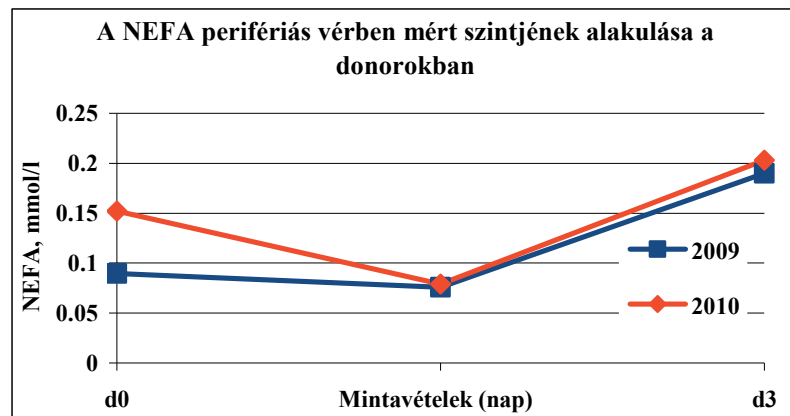
A BHB normál értéke juh esetében kisebb, mint 0,55 mmol/l. 2009-ben szignifikánsan magasabb BHB értékeket mértünk a D0 napon ($p=0,02$), mint a 2010-es évben, de az értékek mindkét vizsgált évben az élettani tartományban voltak (ld. 1. ábra).

1. ábra



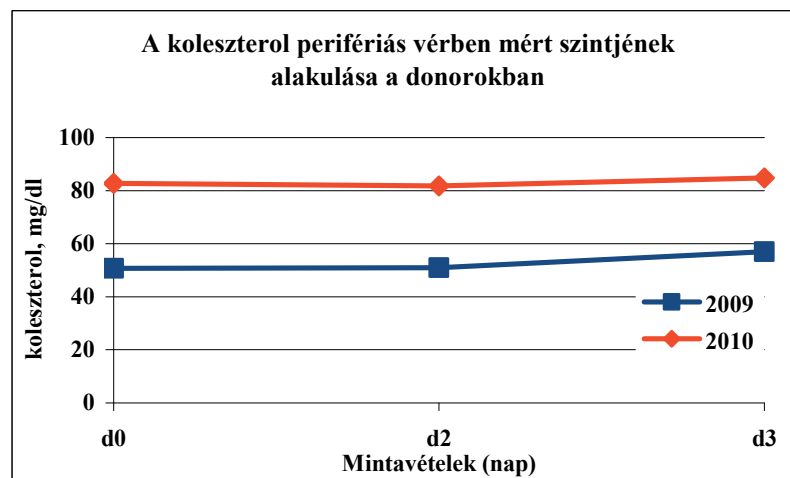
A NEFA élettani határértéke juh fajban 0,2 mmol/l. A mérések azt mutatják, hogy a 2009-ben és a 2010-ben gyűjtött minták között nem volt szignifikáns különbség ($p=0,167$), és a NEFA értékek átlagai mindkét vizsgált évben az élettani tartományban voltak (ld. 2. ábra).

2. ábra



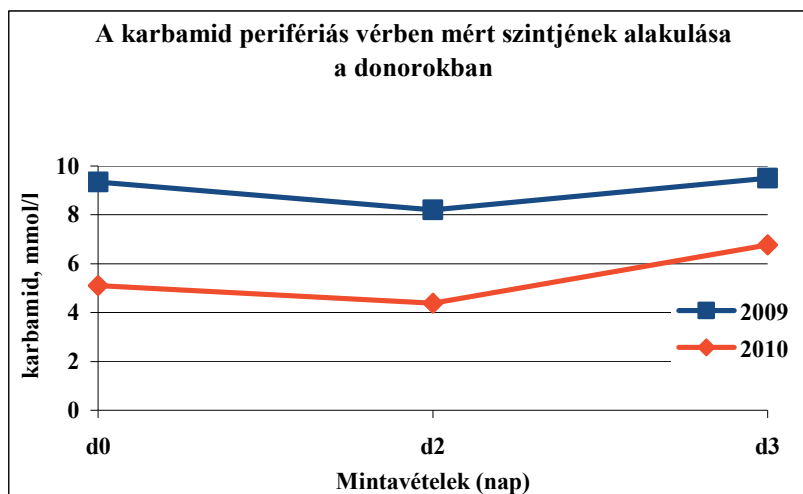
A koleszterol élettani értéke juh esetében 43-103 mg/dl. A koleszterol koncentráció a 2010-es mintákban szignifikánsan magasabb volt mindhárom mintavételi napon ($p < 0,001$). A koleszterol koncentráció mindkét vizsgált évben az élettani tartományba esett (ld. 3. ábra).

3. ábra



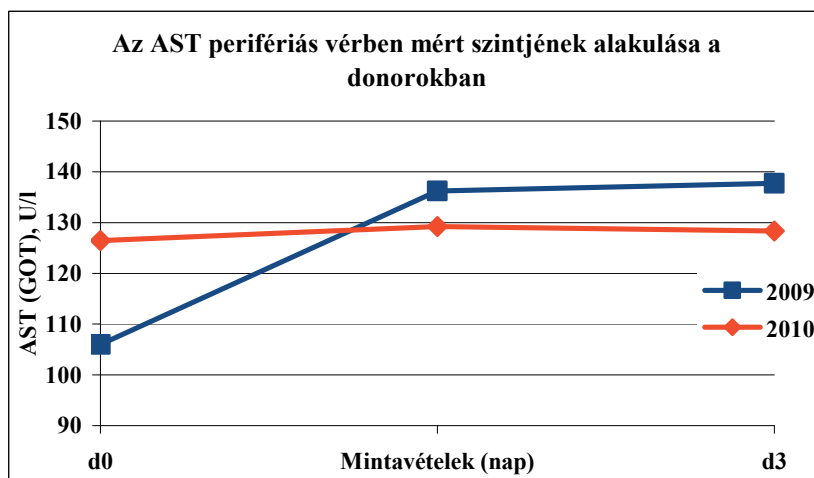
A karbamid élettani értéke juh fajban 3-10 mmol/l. Az értékek mindhárom mintavételi napon, a 2009-es évben szignifikánsan magasabbak ($p < 0,001$), de mindkét évben az élettani tartományban voltak (ld. 4. ábra).

4. ábra



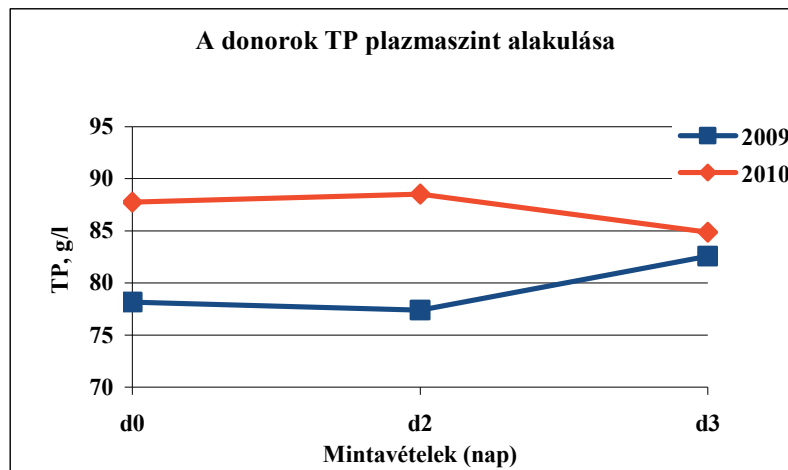
Az AST élettani határértéke juhban 60 U/l. A mért értékek májterhelésre utalnak, a két év értékei között nincs szignifikáns különbség ($p=0,85$) (ld. 5. ábra).

5. ábra



A vérplazma összes fehérjetartalma juh fajban 60-80 g/l között van. A vizsgált mintákban 2010-ben szignifikánsan magasabb volt a TP érték a D0 és D2 napokon, mint 2009-ben ($p<0,001$) (ld. 6. ábra).

6. ábra



4.2.2. A 2009. és 2010. áprilisi program donor állataiból vett vérminták anyagforgalmi paramétereinek vizsgálati eredményei II.

A vizsgált donor állatok (2009. és 2010. áprilisi program) eredményeinek statisztikai feldolgoása a fent leírtak mellett egy másik aspektusból is megtörtént. Ebben az esetben a donor anyajuhokat egy csoportként kezeltük, és így vizsgáltuk a metabolikus paraméterek (BHB, NEFA, TP, karbamid, koleszterol, AST) alakulását és annak hatásait a progeszteron perifériás vérben mért szintjére, a sárgatestek számára, a kinyert és beültethető minőségű embriók számára, valamint a metabolikus hormonok perifériás vérben mért szintjére. A 13. táblázat a vizsgálatokban részt vett donor állatok embriókinyerési eredményeit tartalmazza:

13. táblázat: A 2009-ben és 2010-ben szezonon kívüli időszakban szuperovuláltatott donor anyajuhok embriókinyerési eredményei

DONOR ANYAJUH	SÁRGATESTÉK SZÁMA (db)		KINYERT EMBRIÓ/ BEÜLTETÉSRE ALKALMAS EMBRIÓ (db)
	JOBB PETEFÉSZEK	BAL PETEFÉSZEK	
1.	6	3	6/1
2.	0	0	0
3.	4	1	1/0
4.	3	2	2/0
5.	5	3	5/5 (2 sejtes)
6.	0	0	0

7.	4	5	6/2
8.	4	6	9/9
9.	10	12	17/4
10.	9	5	14/12
11.	7	5	10/7
12.	10	2	10/10

Béta-hidroxi-vajsav (BHB)

A BHB normál értéke juh fajban kisebb, mint 0,55 mmol/l. A donor anyajuhok BHB átlageredményei mindhárom vérvétel esetében az élettani érték alatt voltak, a D0 napon 0,355, a D2-n 0,1875, a D3 napon pedig 0,2708 mmol/l értékekkel.

Nem észterifikált zsírsavak (NEFA)

A NEFA élettani határértéke juh fajban 0,2 mmol/l. A donor anyajuhok NEFA átlageredményei mindhárom vérvétel esetében az élettani érték alatt voltak 0,205, 0,06915, 0,1325 mmol/l értékekkel a D0, D2 és D3 napokon.

Koleszterol

A koleszterol élettani értéke juh esetében 43-103 mg/dl. A donor anyajuhok koleszterol átlageredményei mindhárom vérvétel esetében az élettani értéken belül voltak, 65,25, 61,25 és 68,835 mg/dl értékekkel a D0, D2 és D3 napokon.

Aszpartát-aminotranszferáz (AST/GOT)

Az AST élettani határértéke juh esetében 60 U/l. A donor anyajuhok AST átlageredményei mindhárom vérvétel esetében az élettani értéken felül voltak, 119,41, 157,83 és 161 NE/l értékekkel a D0, D2 és D3 napokon.

Karbamid

A karbamid élettani értéke juh fajban 3-10 mmol/l. A karbamid esetében a vizsgálati átlageredmények a D0 napon 9,0383, a D2 napon 5,07 és a D3 napon 6,6408 mmol/l (az élettani tartományon belül).

Összfehérje (TP)

A vérplazma összes fehérjetartalma juh fajban 60-80 g/l között van. A D0, D2 és D3 napokon 79,70, 77,22 és 77,61 g/l voltak a donorok TP eredményei, az élettani értékeken belül mozgott mindhárom napon.

(A metabolikus paraméterek vizsgálatának fentiekben részletezett eredményeit a 14. táblázatban foglalom össze.)

Az anyagforgalmi paraméterek vizsgálata az I. pontban csak arra terjedt ki, hogy megállapítsuk, volt-e szignifikáns különbség a két vizsgált évben a donor állatok vérmintáinak BHB, TP, karbamid, koleszterol, AST és NEFA perifériás vérben mért szintjében (ld. 14. táblázat). Ezek az eredmények azonban nem feltétlenül hozhatók összefüggésbe az embrióátültetési program eredményességével. Emiatt elvégeztük a fent említett metabolikus paraméterek és a donor állatok sárgatestszáma, kinyert és átültetésre alkalmas embriószáma közötti összefüggések feltárását is.

14. táblázat: A 2009. és 2010. áprilisi program donor állataiból vett vérminták anyagforgalmi paramétereinek vizsgálati eredményei- összefoglalás

	BHB (mmol/l)	NEFA (mmol/l)	Koleszterol (mg/dl)	Karbamid (mmol/l)	AST (U/l)	TP (g/l)
Élettani határérték*	<0,55	<0,2	43-103	3-10	<60	60-80
D0 átlag**	0,355	0,205	65,25	9,0383	119,41	79,70
D2 átlag**	0,1875	0,06915	61,25	5,07	157,83	77,22
D3 átlag**	0,2708	0,1325	68,835	6,6408	161	77,61
2009. és 2010. év	D0 szign. magasabb 2009- ben (0,38 vs 0,34 mmol/l)	D0 szign. magasabb 2010-ben (0,18 vs 0,23 mmol/l)	Nincs szign. kül. a 2 év között	D0, D2 és D3 szign. magasabb 2009- ben (11,55, 5,45, 7,5 vs 6,53, 4,69, 5,68 mmol/l)	Nincs szign. kül. a 2 év között	D0, D2, D3 szign. magasabb 2010-ben (73,07, 69,53, 74,11 vs 86.34, 84,91, 81,13 g/l)

* GAÁL, 1999; RADOSTITS és mtsai, 2007

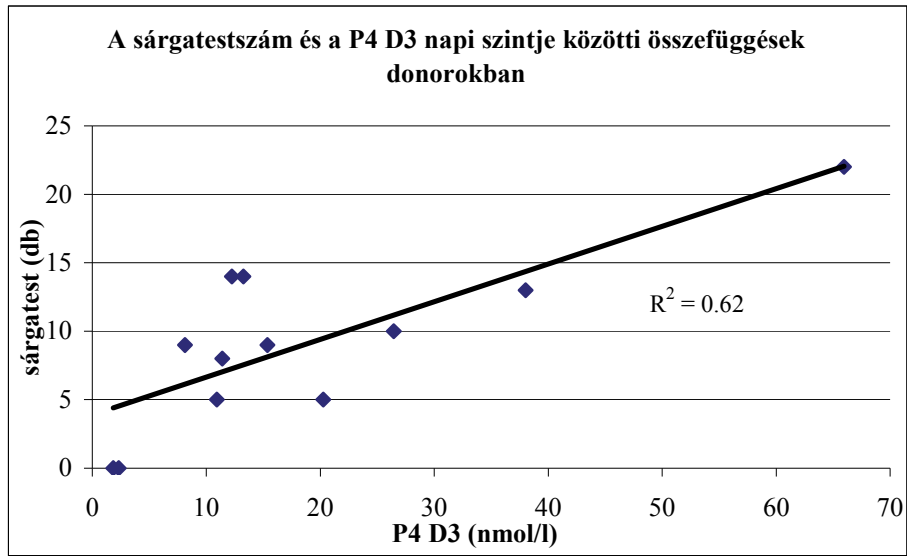
** minden donor anyajuh eredményét figyelembe véve (2009. és 2010.)

A metabolikus paraméterek és a donor állatok sárgatestszáma, kinyert és átültetésre alkalmas embriók száma közötti összefüggések

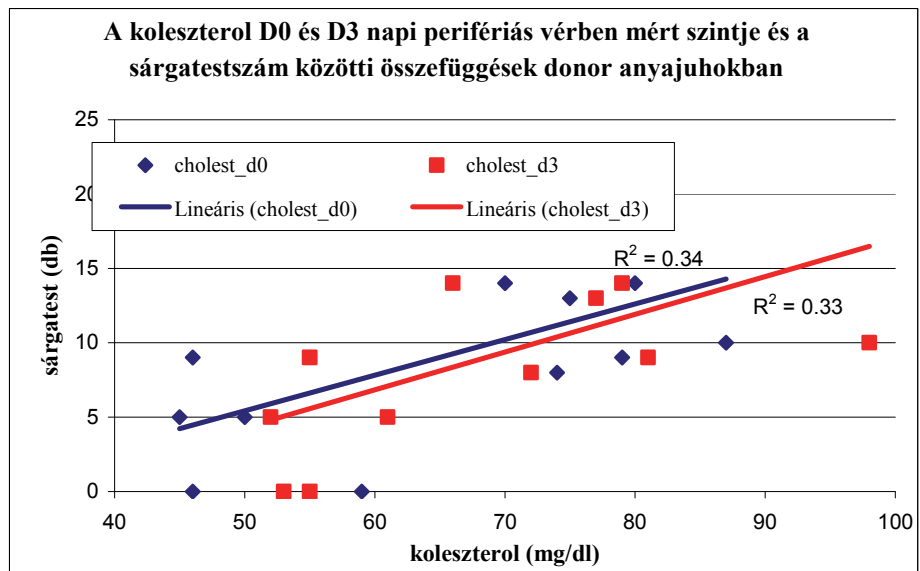
A sárgatestek (CL) száma

A CL szám szignifikáns pozitív összefüggést mutat a D3 napi progeszteron perifériás vérben mért szintjével (ld. 7. ábra). A BHB, NEFA és TP perifériás vérben mért szintje nem volt hatással a CL számra, egyik mintavételi napon sem. A koleszterol D0 és D3 napi szintje szignifikáns pozitív (ld. 8. ábra), míg az AST D2 napi (ld. 9. ábra), és a karbamid D0 napi perifériás vérben mért szintje szignifikáns negatív hatással volt a CL számra donor anyajuhok esetében (ld. 10. ábra).

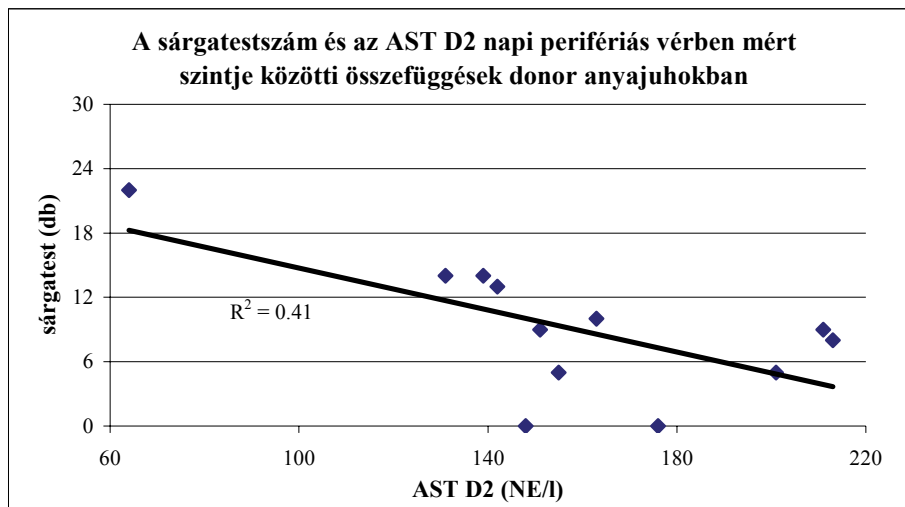
7. ábra



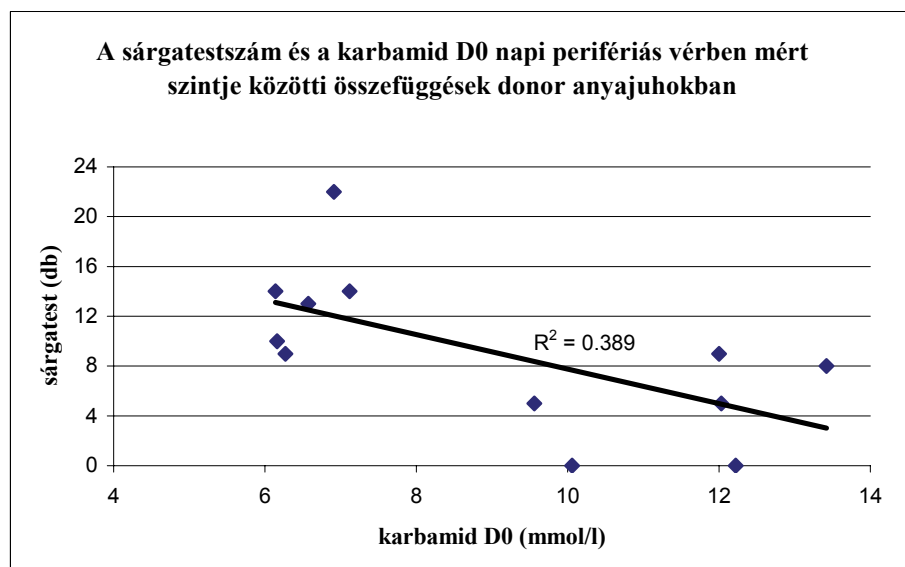
8. ábra



9. ábra



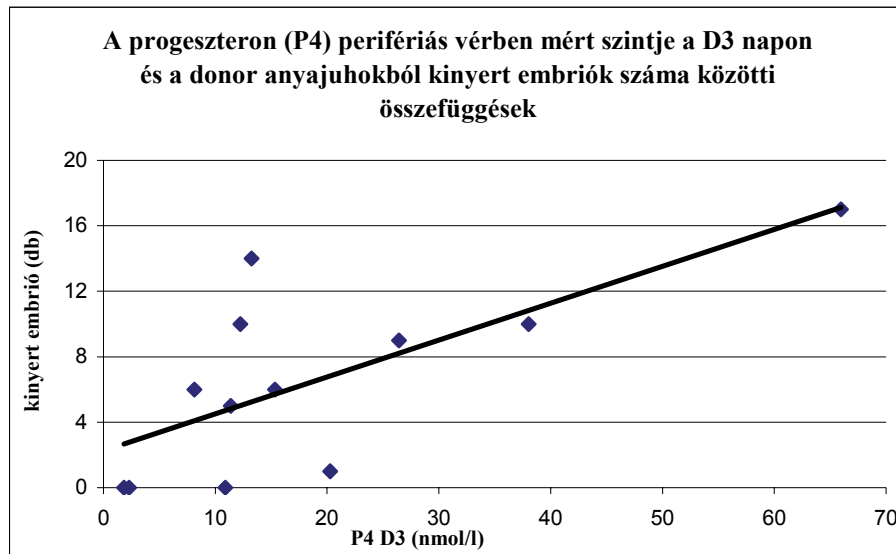
10. ábra



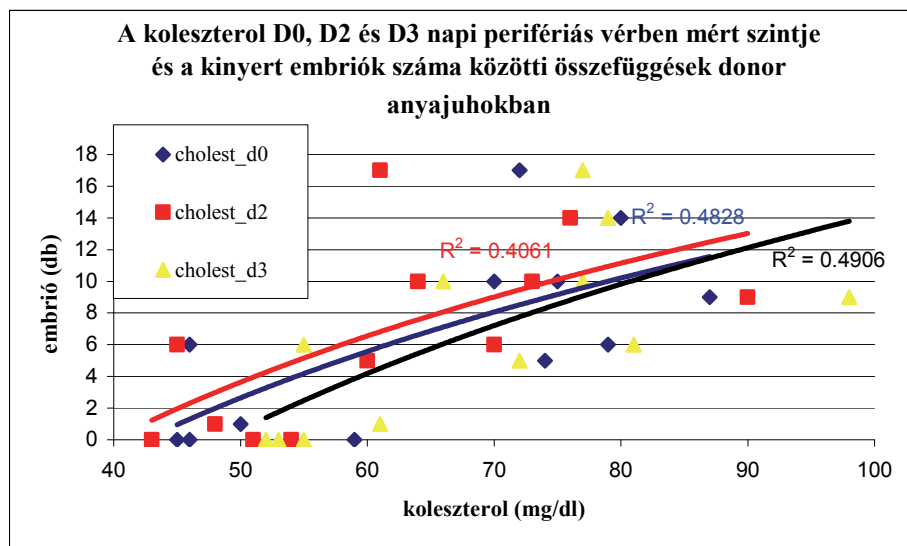
A kinyert embriók száma

A gyűjtött embriók száma szignifikáns pozitív összefüggést mutat a D3 napi progeszteron szinttel (ld. 11. ábra). A BHB perifériás vérben mért szintje nem befolyásolta a kinyert embriók számát egyik mintavételi napon sem. A D0, D2 és D3 napi koleszterol (ld. 12. ábra) és NEFA értéke (ld. 13. ábra) szignifikáns pozitív kapcsolatot mutat a gyűjtött embriók számával, míg a D0 napi karbamid (ld. 14. ábra) és a D2 napi AST (ld. 15. ábra) esetében ez a kapcsolat szignifikáns negatívnak bizonyult.

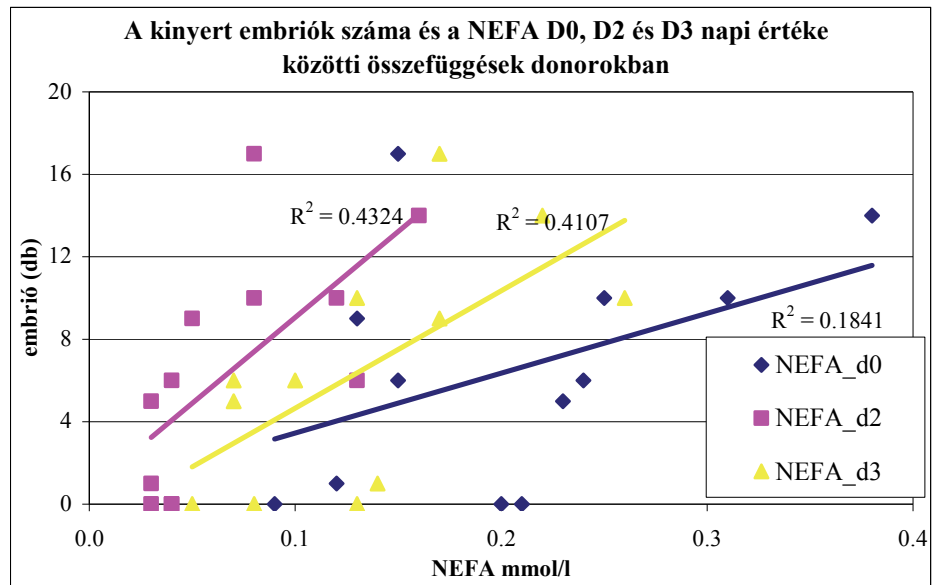
11. ábra



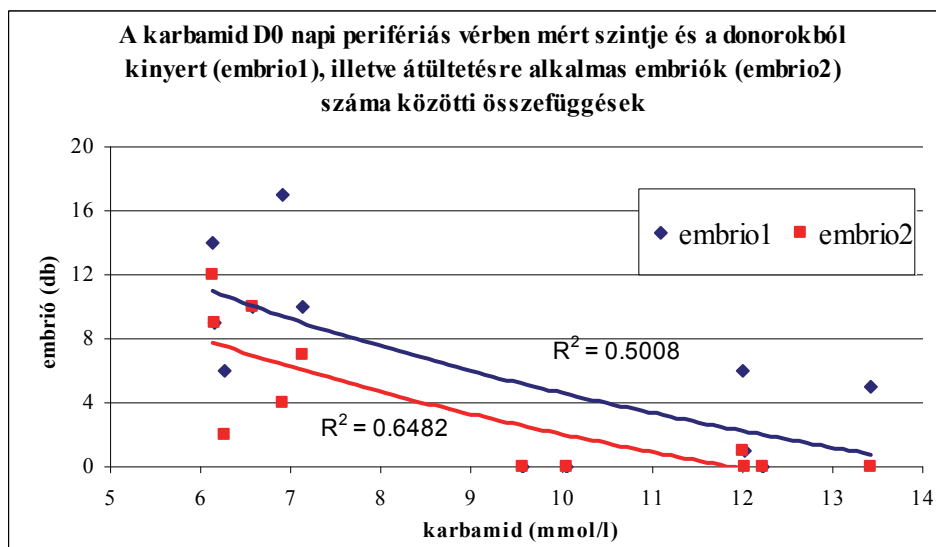
12. ábra



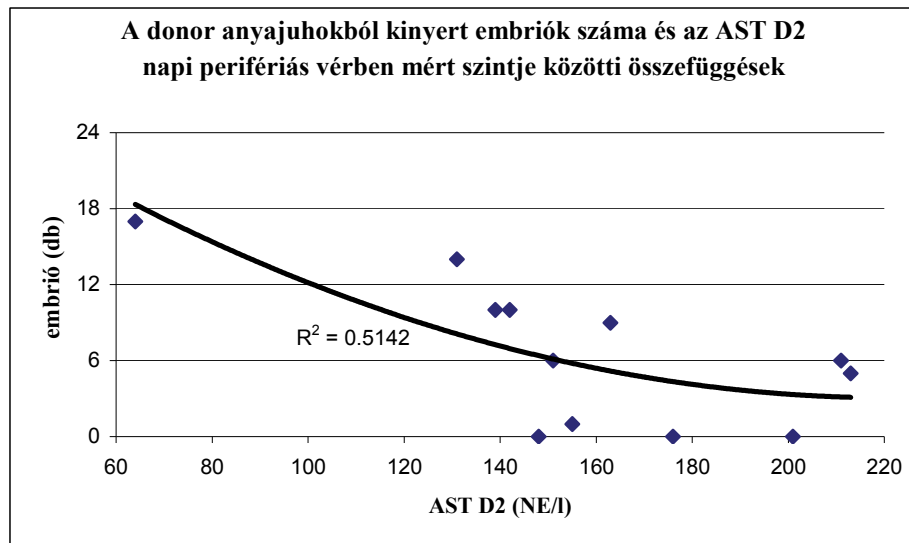
13. ábra



14. ábra



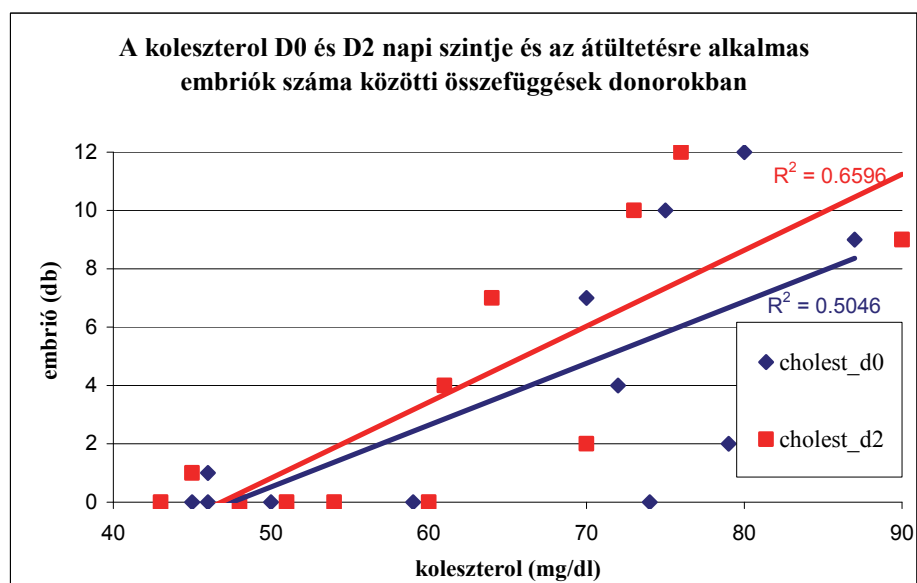
15. ábra



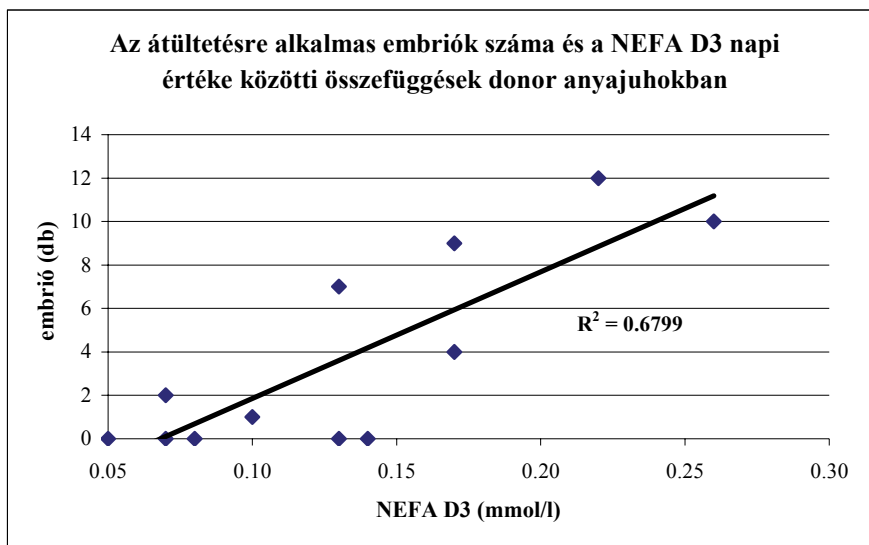
Az átültetésre alkalmas embriók száma

Egyik mintavételi napon sem találtunk összefüggést az átültetésre alkalmas embriók száma és a P4, TP, BHB, AST értéke között. A koleszterol D0 és D2 (ld. 16. ábra), valamint a NEFA D3 napi perifériás vérben mért szintje (ld. 17. ábra) szignifikáns pozitív, míg a karbamid D0 napi szintje szignifikáns negatív összefüggésben van (ld. 14. ábra) az átültethető embriószámmal.

16. ábra



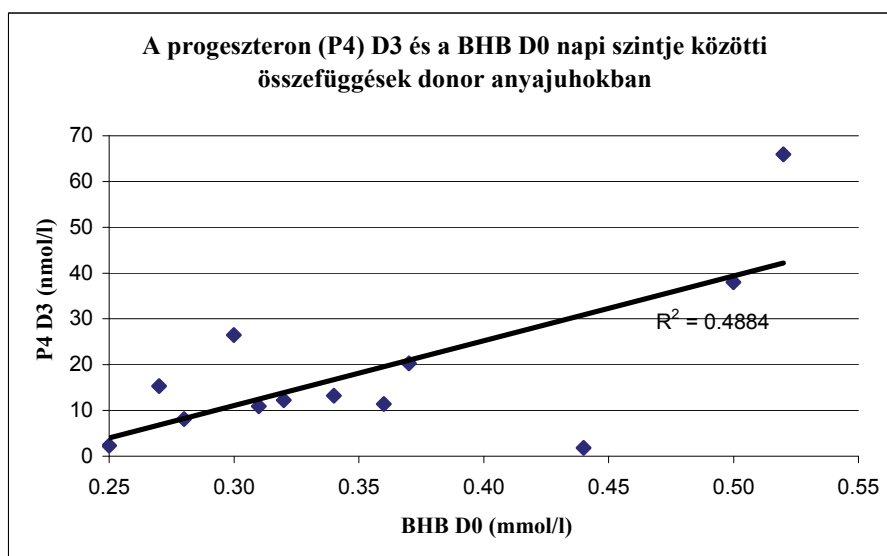
17. ábra



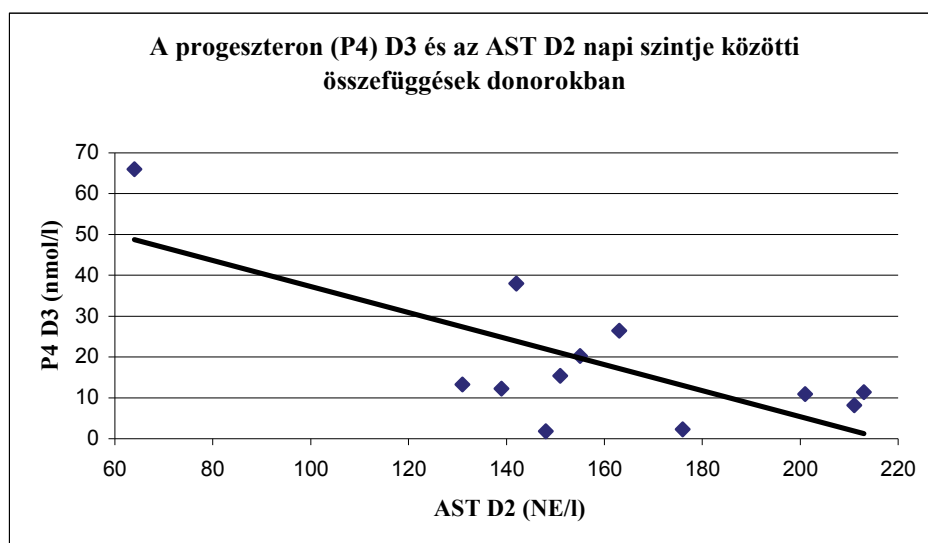
A progeszteron perifériás vérben mért szintje

A progeszteron szintje a D3 napon szignifikáns pozitív összefüggésben van a BHB D0 napi plazma szintjével (ld. 18. ábra), valamint a CL számmal (ld. 7. ábra) és a kinyert embriók számával (ld. 11. ábra). Szignifikáns negatív az összefüggés az AST D2 napi perifériás vérben mért szintje és a P4 értéke között (ld. 19. ábra).

18. ábra



19. ábra



4.3. A donor és recipiens állatok metabolikus hormonvizsgálatának eredményei

A következőkben a metabolikus hormonvizsgálatok eredményeit ismertetem. A négy program eredményeinek elemzése, értékelése és statisztikai analízise során világossá vált, hogy szerencsésebb, ha a 2009. áprilisi programot kihagyjuk a statisztikai értékelésből. A fent említett program ugyanis annyira eltérő eredményeket produkált a már korábban vázolt okok miatt (**nem megfelelő tápanyagellátás, metabolikus paraméterek perifériás vérben mért szintjének szignifikáns különbségei a 2009-es és 2010-es évben, ld. 1-6. ábra**), hogy az nagymértékben torzította volna a többi program értékelését és ezen keresztül a levont következtetéseket.

A statisztikai értékelésnél minden esetben elkülönítettük a donor és a recipiens állatokat.

Külön-külön értékeltük a 2009-es (csak a februári programot vettük figyelembe; lásd korábban), és a 2010-es programokat, majd a két évet összevonva is értékeltük (szintén külön-külön vizsgálva a szezonon belüli és a szezonon kívüli időszakot). Az értékelés során, mint az a későbbiekben az eredmények leírásánál egyértelművé válik, fontos volt külön-külön elemezni a szezonon belüli és az azon kívüli programok eredményeit, hiszen több vizsgált metabolikus hormon, és a progeszteron esetében is

kiderült, hogy szignifikáns különbség van a perifériás vérben mért szintjükben, szezonban és azon kívül.

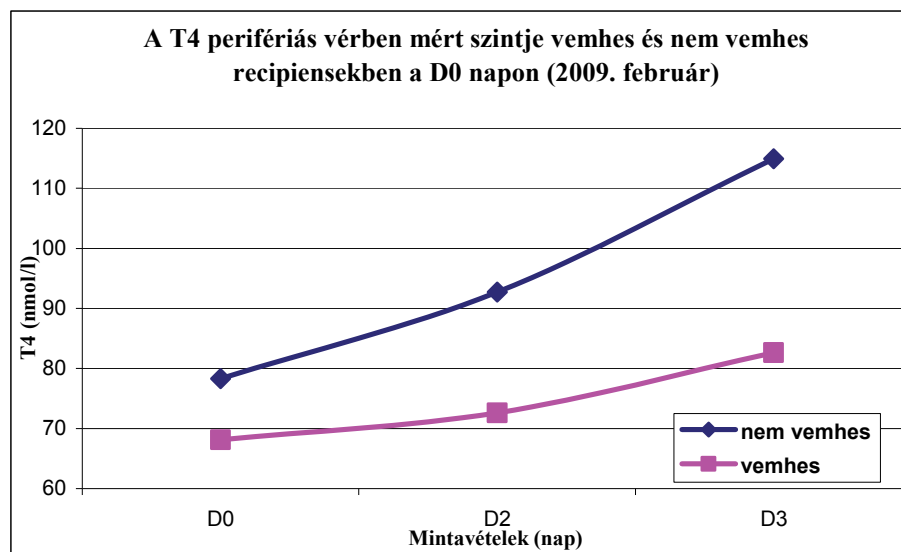
Az adatok vizsgálatánál mindig elkülönítettük a donor és a recipiens állatok csoportjait. Az eredmények fejezet végén a donor és recipiens állatokban szezonon belül és azon kívüli időszakban az egyes metabolikus hormonok, és a progeszteron perifériás vérben mért szintjének alakulásában tapasztalt változásokat foglalom össze.

4.3.1. A 2009. februári (szezonon belüli) program eredményei

4.3.1.1. A 2009. februári (szezonon belüli) program recipiens anyajuhainak eredményei

A recipiens állatok esetében szignifikáns összefüggést találtunk a tiroxin (T4) szintje és a vemhesülés között szezonon belül. Az EÁ során vemhesülő állatok T4 szintje szignifikánsan alacsonyabb volt a D0 napon, mint nem vemhesült társaiké (ld. 20. ábra).

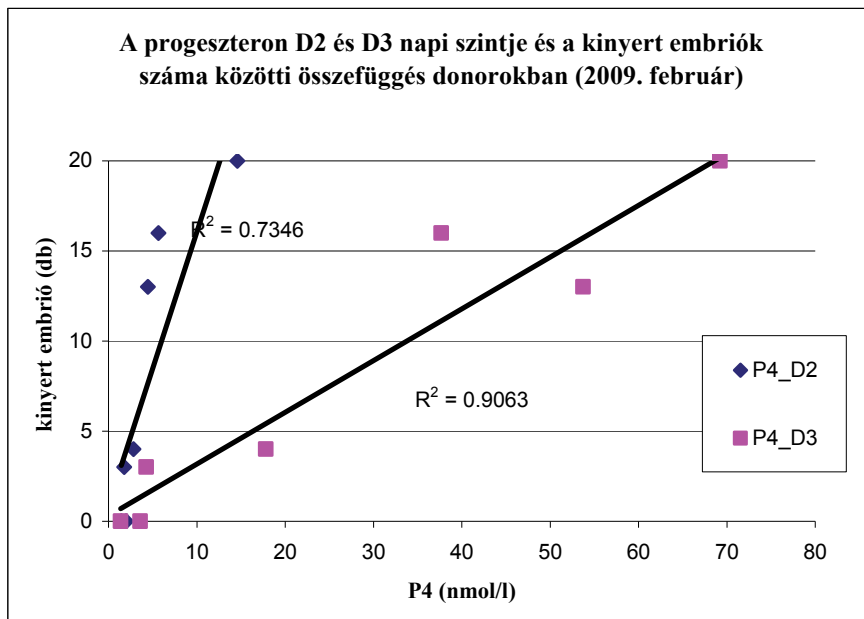
20. ábra



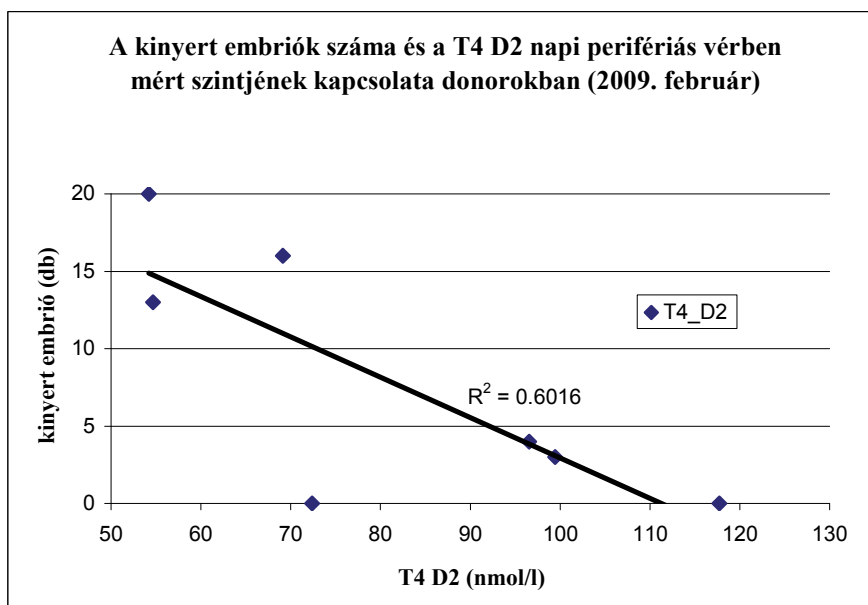
4.3.1.2. A 2009. februári (szezonon belüli) program donor állatainak eredményei

A 2009. februári programban a donor anyajuhok esetében a kinyert embriók száma szignifikáns összefüggést mutatott a progeszteron D2, és D3 perifériás vérben mért szintjével (ld. 21. ábra). Minél magasabb volt az említett napokon a P4 szintje, annál több embriót gyűjtöttünk. Szignifikáns negatív összefüggést állapítottunk meg a kinyert embriók száma és a T4 D0 ($P \leq 0.1$) és D2 (ld. 22. ábra), és szignifikáns pozitívat az IGF-1 D0 ($P \leq 0.1$) napi szintje között (ld. 23. ábra).

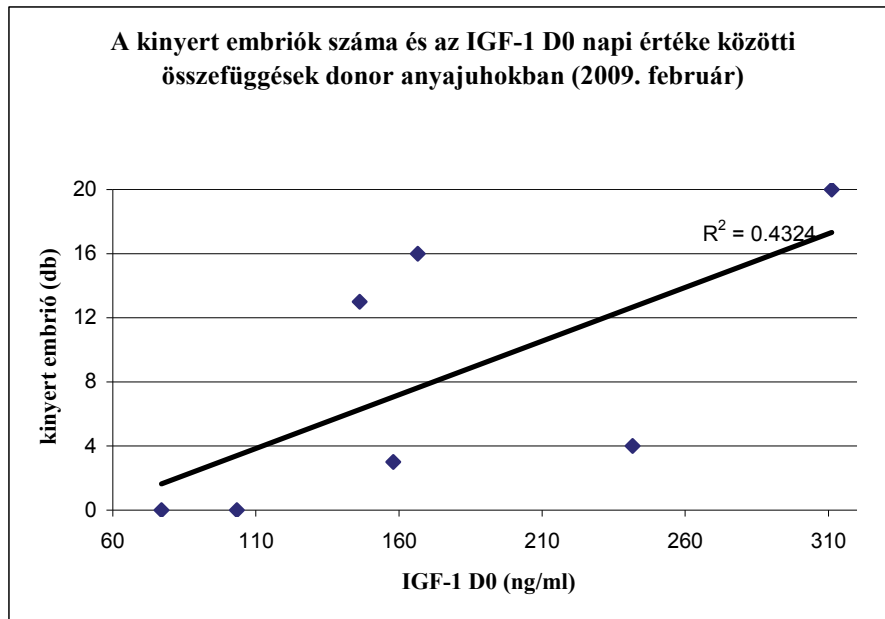
21. ábra



22. ábra

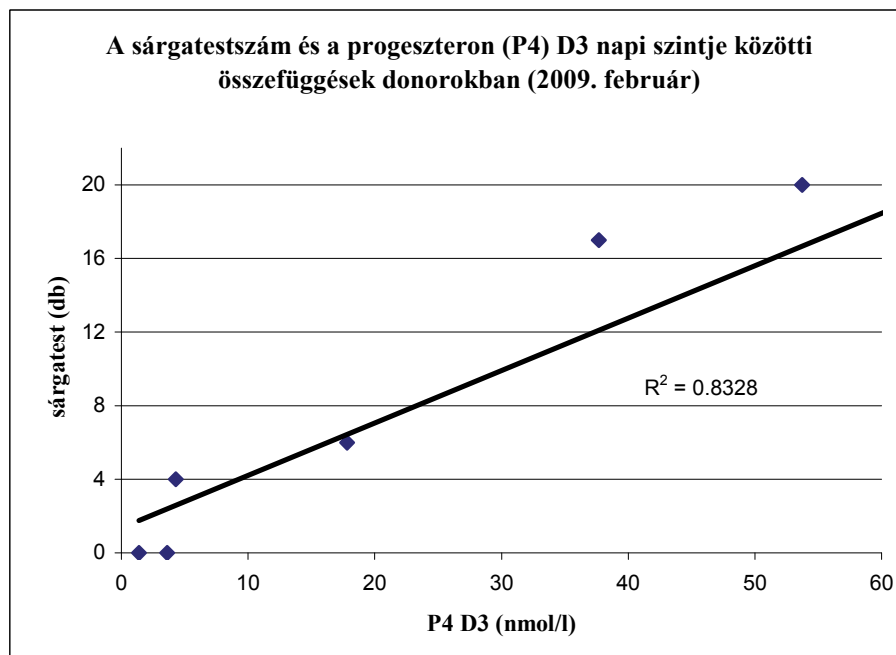


23. ábra

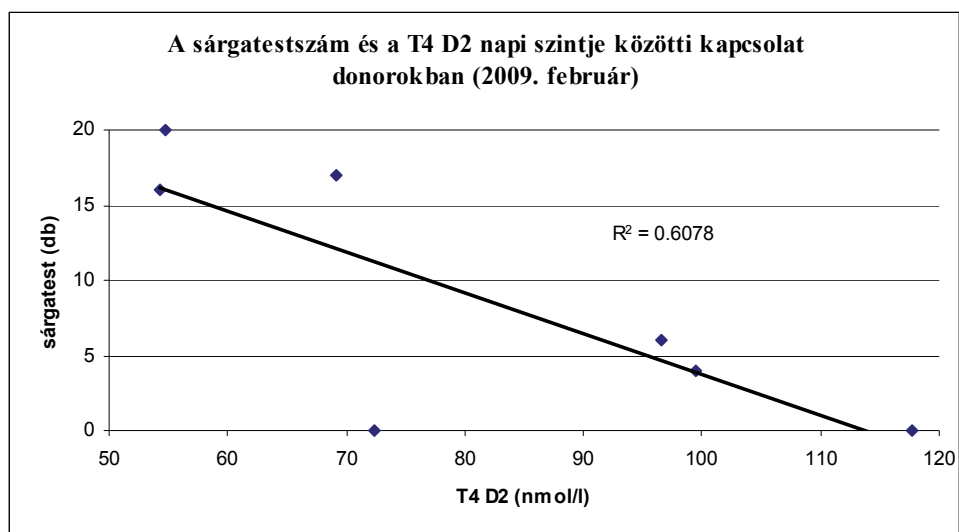


A 2009. februári programban a donor anyajuhok esetében az embriókinyerés idejében megszámlolt corpus luteumok (CL) száma szignifikáns összefüggést mutatott a progeszteron D3 napi perifériás vérben mért szintjével (24. ábra). Minél magasabb volt az említett napon a P4 szintje, annál több CL-t számoltunk össze a donor állatok petefészekén. Szignifikáns negatív összefüggést állapítottunk meg a CL szám és a T4 D0 ($P \leq 0.1$) és D2 napi szintje között (ld. 25. ábra).

24. ábra



25. ábra

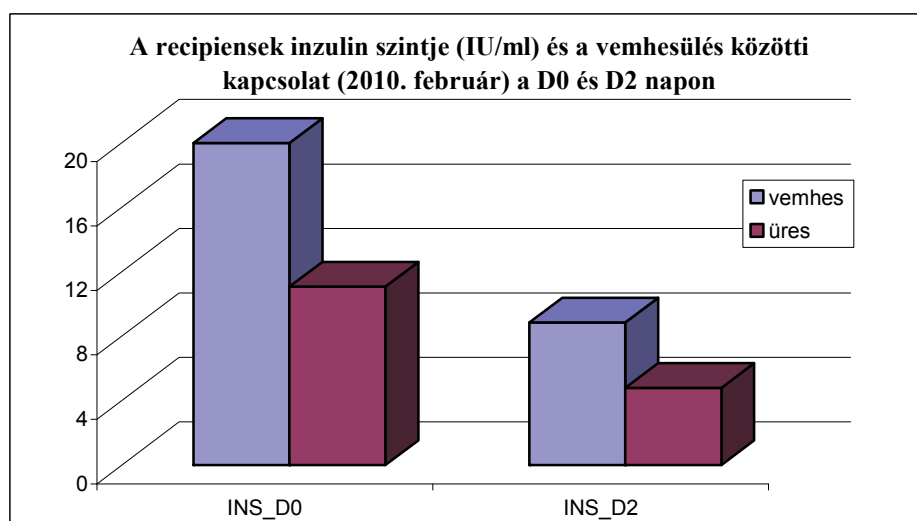


4.3.2. A 2010. év eredményei szezonon belül (2010. február)

4.3.2.1. A 2010. februári programban részt vett recipiens anyajuhok eredményei

2010. februárjában szignifikáns pozitív összefüggést találtunk a recipiensek későbbi vemhesülése (embrió megtapadása) és az inzulin D0 és D2 ($P \leq 0.1$) napi vérben mért szintjének alakulása között (ld. 26. ábra).

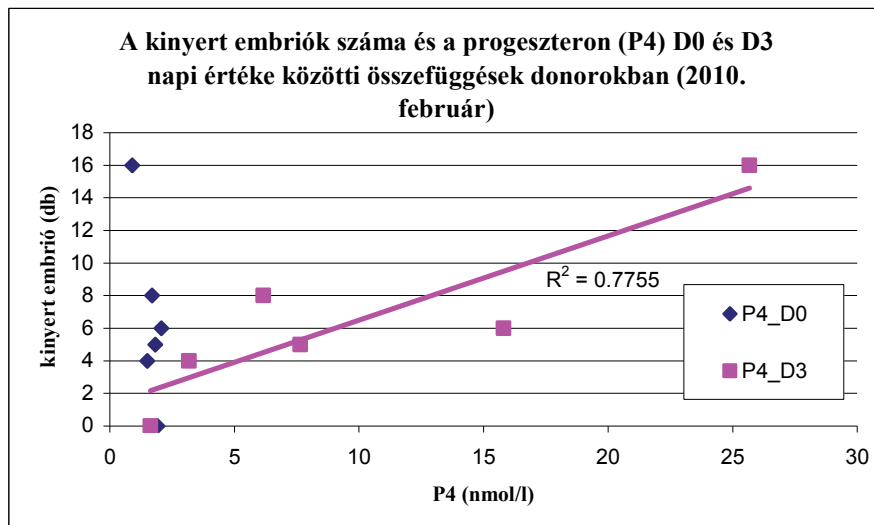
26. ábra



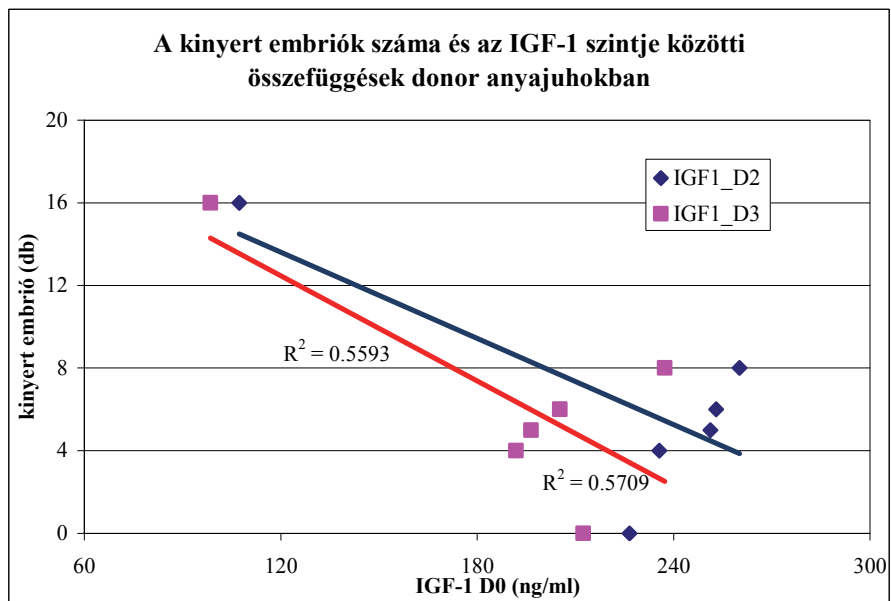
4.3.2.2. A 2010. februári program donor anyajuhainak eredményei

A 2010. februári programban a donor anyajuhok esetében a kinyert embriók száma szignifikáns összefüggést mutatott a progeszteron D0 ($P \leq 0.1$), és D3 napi értékével (ld. 27. ábra). Minél magasabb volt az említett napokon a P4 szintje, annál több embriót gyűjtöttünk a donorokból. Szignifikáns ($P \leq 0.1$) negatív összefüggést találtunk a kinyert embriók száma és az IGF-1 D2, valamint az IGF-1 D3 ($P \leq 0.1$) napi szintje között (ld. 28. ábra).

27. ábra

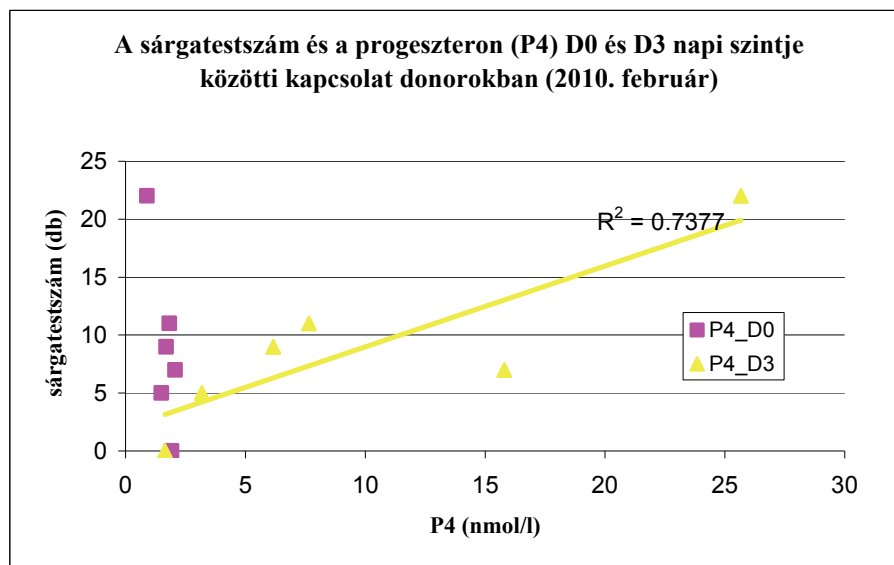


28. ábra

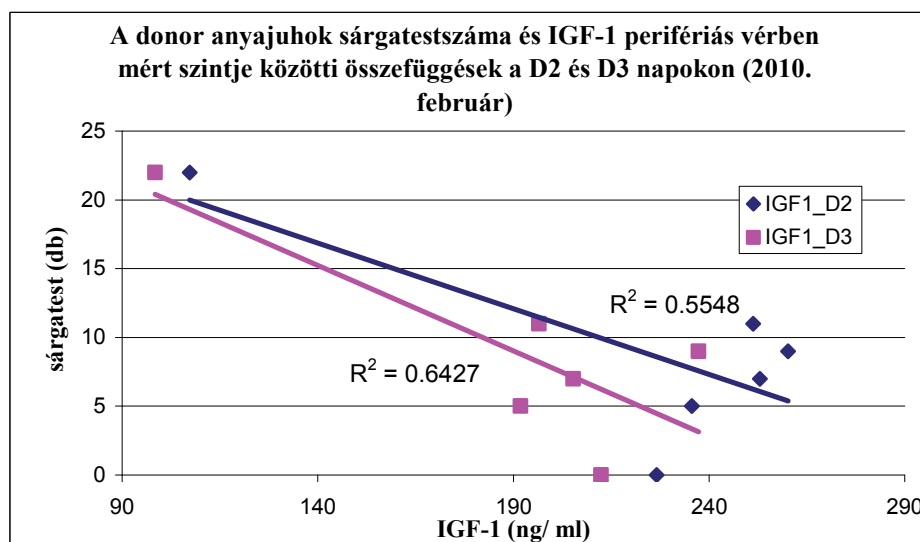


A 2010. februári programban a donor anyajuhok esetében az embriómosás idejében megszámlált corpus luteumok (CL) száma szignifikáns összefüggést mutatott a progeszteron D0 ($P \leq 0.1$) és D3 napi perifériás vérben mért szintjével (ld. 29. ábra). Minél magasabb volt az említett napon a P4 szintje, annál több CL-t számoltunk össze a donor állatok petefészkein. Szignifikáns negatív összefüggést figyeltünk meg a CL szám és az IGF-1 D2 ($P \leq 0.1$) és D3 ($P \leq 0.1$) napi vérben mért értéke között (ld. 30. ábra).

29. ábra



30. ábra



4.3.3. A 2010. áprilisi (szezonon kívüli) program eredményei

A 2010. áprilisi programot egyetlen szezonon kívüli programként értékeltük (a 2009-es szezonon kívüli program statisztikai értékelésből való kizárása miatt). A recipiensek esetében ebben a programban nem sikerült szignifikáns összefüggést kimutatni.

4.3.3.1. A 2010. februári programban részt vett donor anyajuhok eredményei

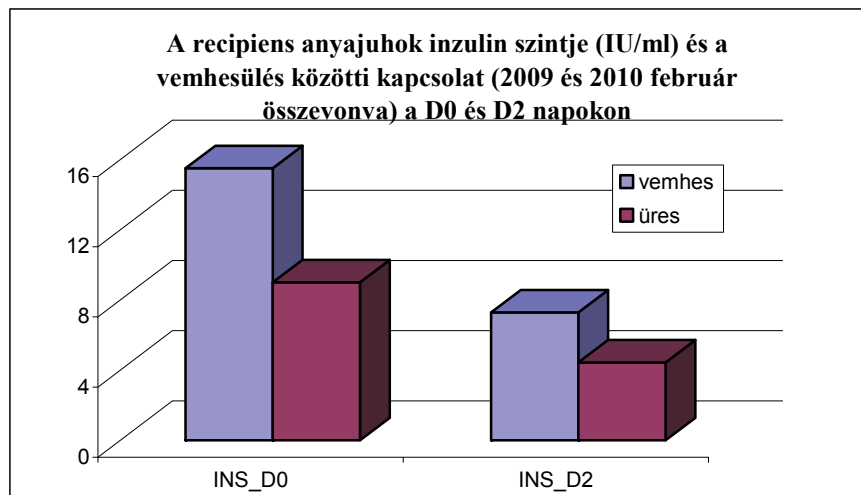
A donor anyajuhok esetében azonban kimutattuk, hogy a kimosott embriók száma szignifikáns pozitív összefüggést mutat a T3 D2 napi értékével ($P \leq 0.1$), míg a CL szám pozitívan korrelál a P4 D2 és D3 ($P \leq 0.1$), valamint az inzulin D3 napi ($P \leq 0.1$) perifériás vérben mért szintjével.

4.3.4. A 2009. és a 2010. évben végzett vizsgálatok összevont eredményei szezonon belül

4.3.4.1. A recipiens anyajuhok összevont vizsgálati eredményei (2009. és 2010. február)

Az összevont vizsgálatokban szignifikáns pozitív összefüggést találtunk a recipiensek későbbi vemhesülése (embrió megtapadása) és az inzulin D0 ($P \leq 0.1$) és D2 ($P \leq 0.1$) napi vérben mért szintjének alakulása között. Ezek az eredmények (az 5 és 10%-os szignifikanciáktól eltekintve) azonosak a 2010-ben tapasztaltakkal, tehát az összevont vizsgálatokban a nagyobb elemszám csak megerősítette az adatok helyességét (ld. 31. ábra).

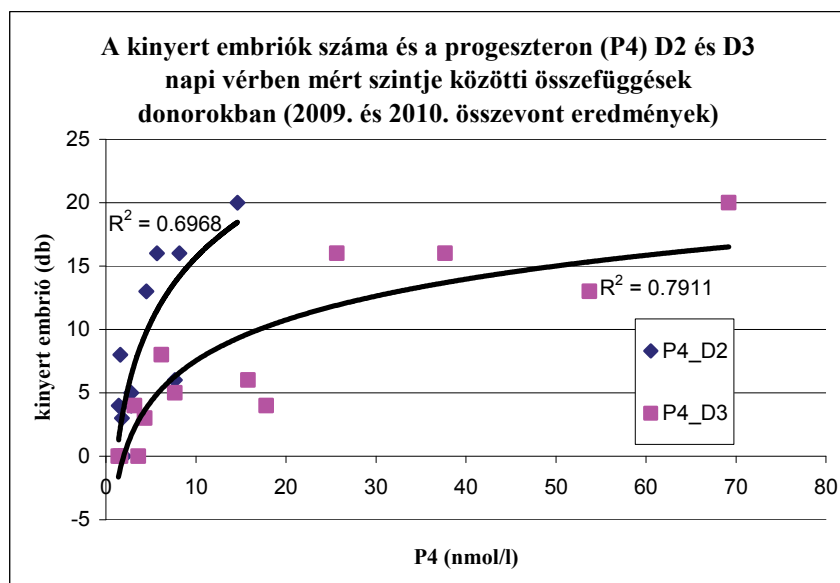
31. ábra



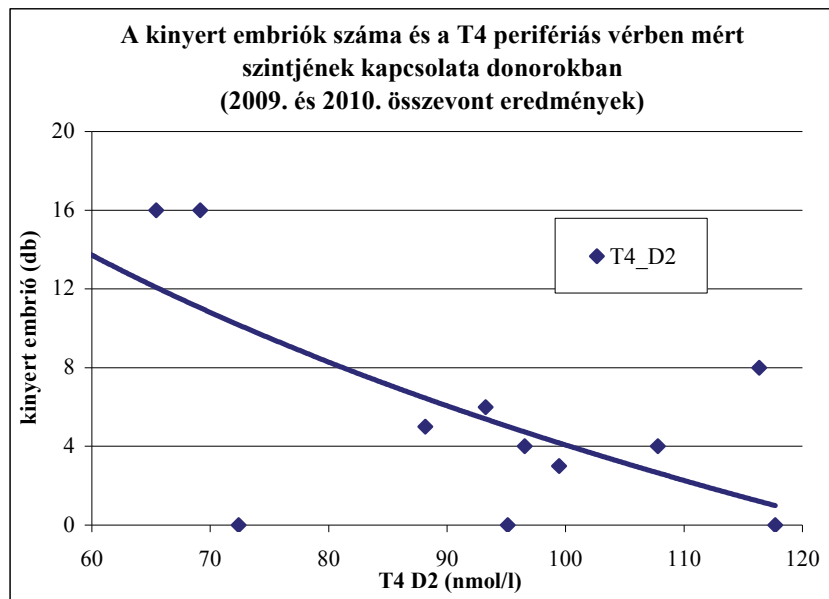
4.3.4.2. A donor anyajuhok eredményei az összevont vizsgálatokban

A 2009. és a 2010. évi februári programokat összevonva a donor anyajuhok esetében a gyűjtött embriók száma szignifikáns összefüggést mutatott a progeszteron D2, és D3 napi vérben mért szintjével (32. ábra). Minél magasabb volt az említett napokon a P4 szintje, annál több embriót nyertünk a donorokból. Szignifikáns negatív összefüggést állapítottunk meg a kinyert embriók száma és a T4 D2 napi vérben mért szintje között (ld. 33. ábra).

32. ábra

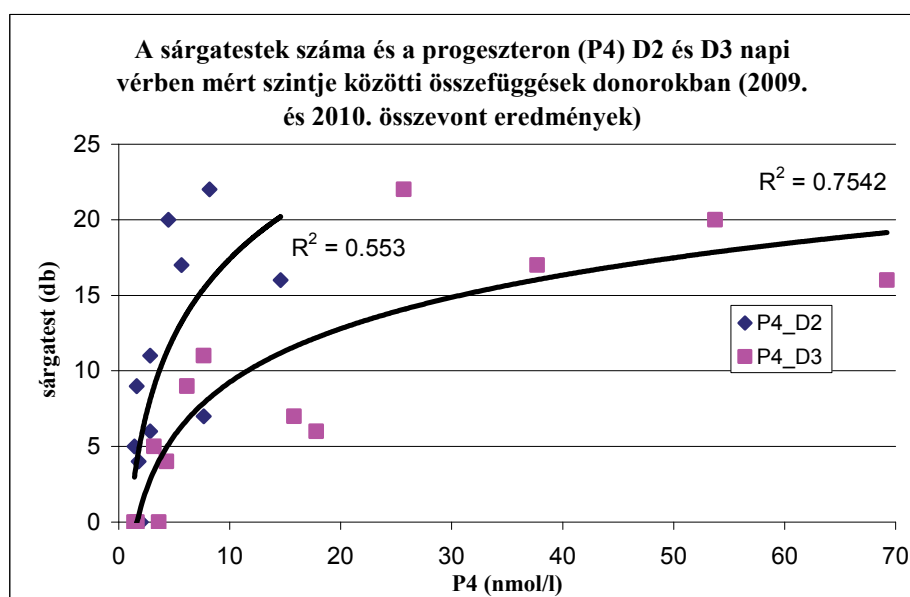


33. ábra

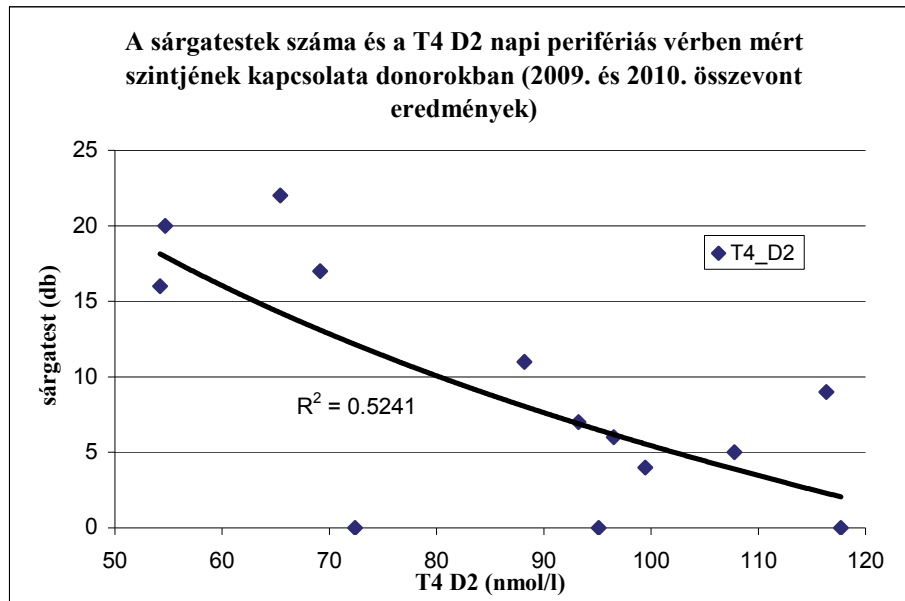


Az összevont vizsgálatokban a donor anyajuhok esetében az embriókinyerés idejében megszámlált sárgatestek (CL) száma szignifikáns összefüggést mutatott a progeszteron D2 és D3 napi szintjével (34. ábra). Minél magasabb volt az említett napon a P4 szint, annál több CL-t számoltunk össze a donor állatok petefészkein. Szignifikáns negatív összefüggést figyeltünk meg a CL szám és a T4 D2 napi vérben mért szintje között (ld. 35. ábra).

34. ábra



35. ábra



A donor állatok összevont eredményeiben továbbá az IGF-1 D0-D2, valamint az IGF-1 D0-D3 napi perifériás vérben mért szintjének változása szignifikáns pozitív összefüggést mutat mind a kinyert embriók, mind a donorok petefészkein levő sárgatestek számával. Tehát minél inkább lecsökkent a vérvételi időpontok között az IGF-1 értéke, annál több CL és kinyert embrió volt az eredmény donoronként!

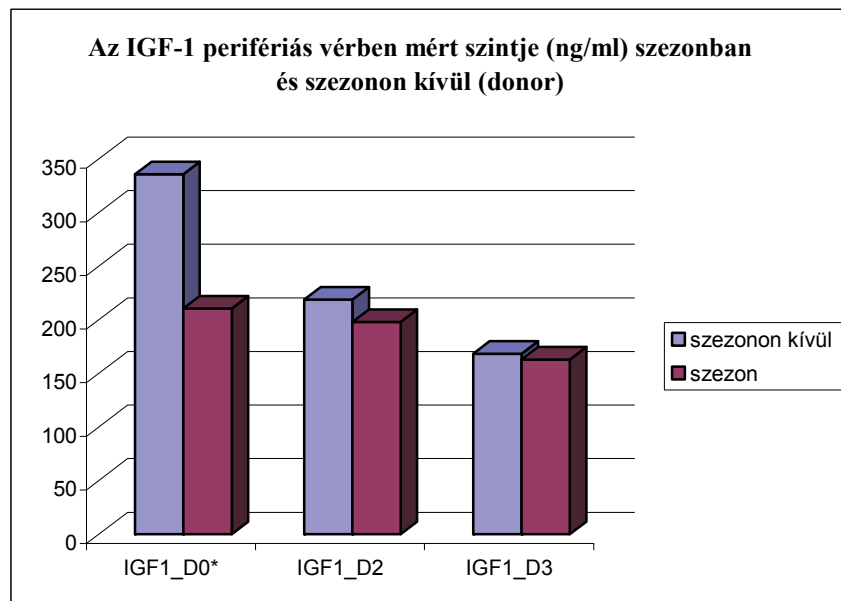
4.3.5. A szezonon belüli és a szezonon kívüli időszak összehasonlítása

A korábbi fejezetekben leírtak alapján feltételezhető volt, hogy a metabolikus hormonok, és a P4 perifériás vérben mért szintjében különbség lesz szezonon belül és azon kívüli időszakban. Az éveket összevontan vizsgáltuk, tehát a 2009. és 2010. év februárjait hasonlítottuk össze 2010. áprilisának eredményeivel. A donor és a recipiens állatokat ebben az esetben is elkülönítettük egymástól az adatok elemzése során.

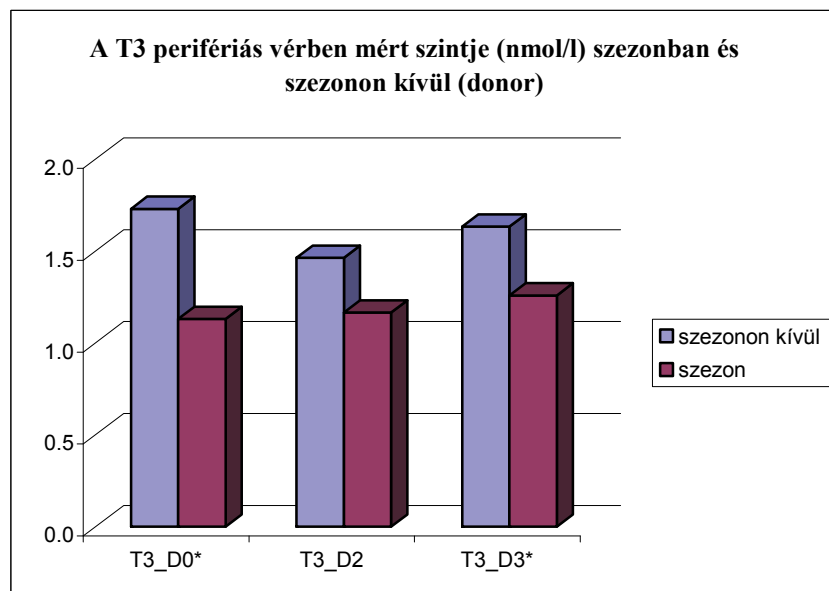
4.3.5.1. A donor anyajuhok perifériás vérben mért hormonszintjében tapasztalt különbségek szezonon belül és azon kívüli időszakban

Donorok esetében szignifikáns különbség volt az IGF-1 D0 napi (ld. 36. ábra) T3 D0 és D3 ($P \leq 0.1$) napi (ld. 37. ábra) perifériás vérben mért szintjei között szezonban és azon kívül. Minden paraméter a szezonon kívüli (áprilisi) időszakban mutatott magasabb értékeket.

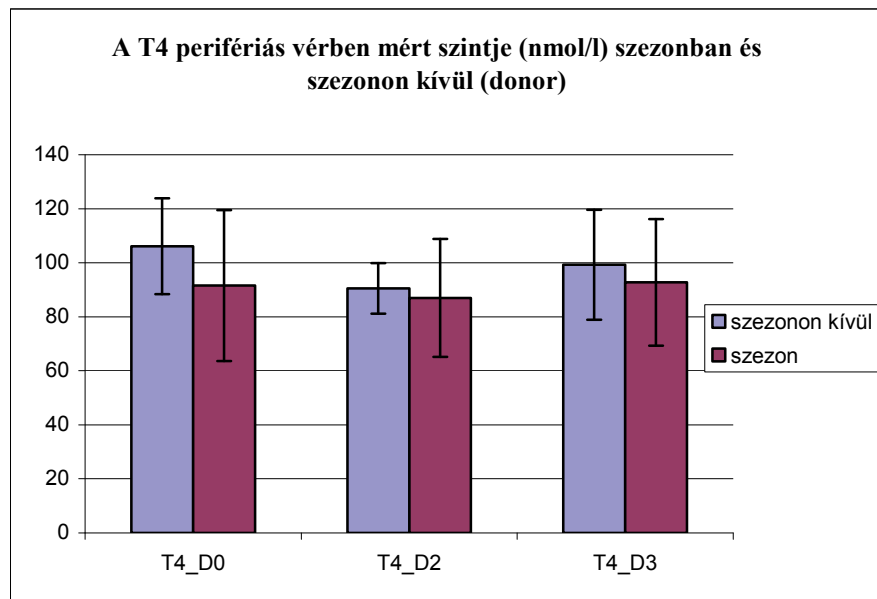
36. ábra



37. ábra



38. ábra

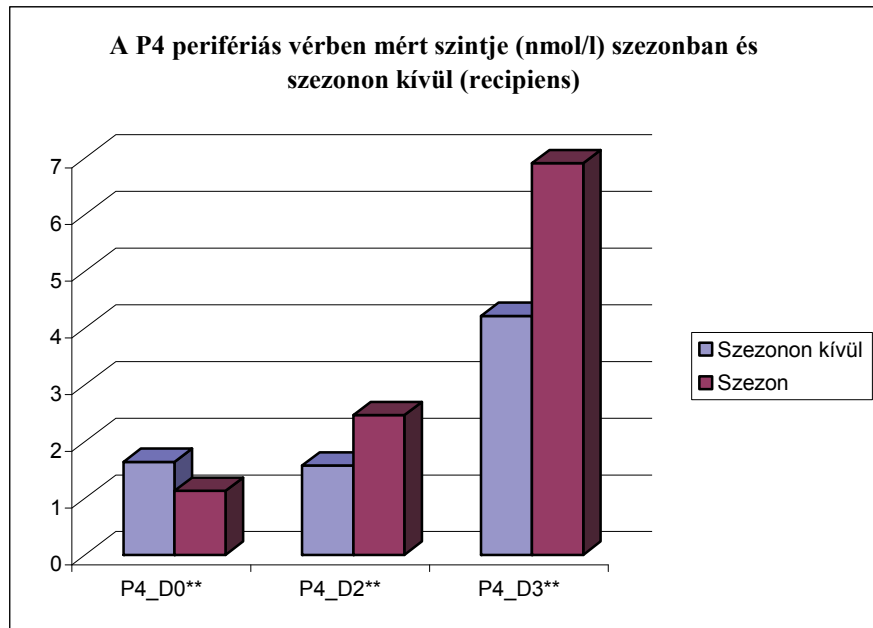


A T4 szintje szezonon kívüli időszakban magasabb, de ezt csak tendenciaként említhetjük (38. ábra).

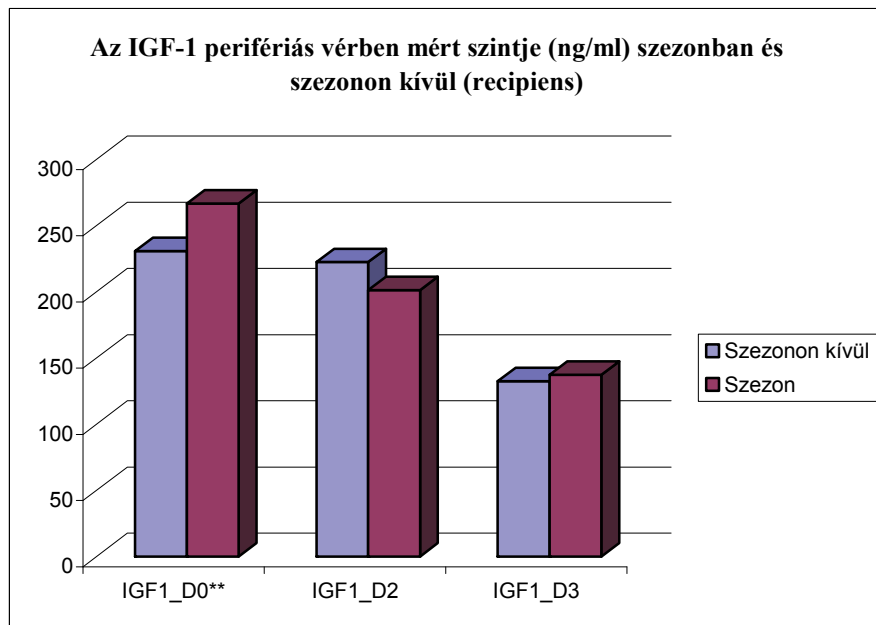
4.3.5.2. A recipiens anyajuhok perifériás vérben mért hormonszintjében tapasztalt különbségek szezonon belül és azon kívüli időszakban

Recipiens állatok esetében szignifikáns különbség volt a progeszteron D0, D2 és D3 napi (ld. 39. ábra), az IGF-1 D0 napi (ld. 40. ábra), a T3 D3 napi (ld. 41. ábra) és az inzulin D0 napi szintje (ld. 42. ábra) között szezonon belül és azon kívül. A progeszteron D0 napi és a T3 D3 napi értéke a szezonon kívüli időszakban, míg a P4 D2 és D3 napi értékei, az IGF-1 és az inzulin D0 napi értéke szezonban volt magasabb.

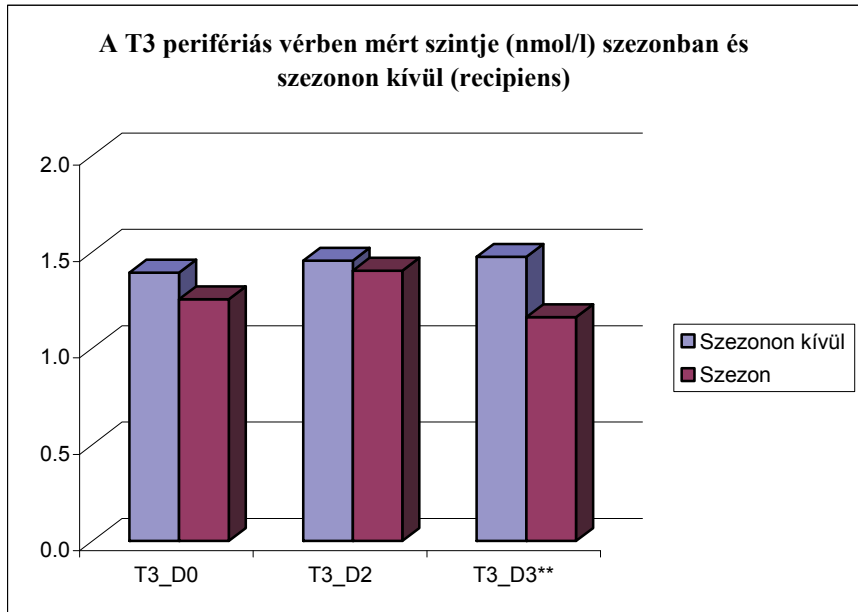
39. ábra



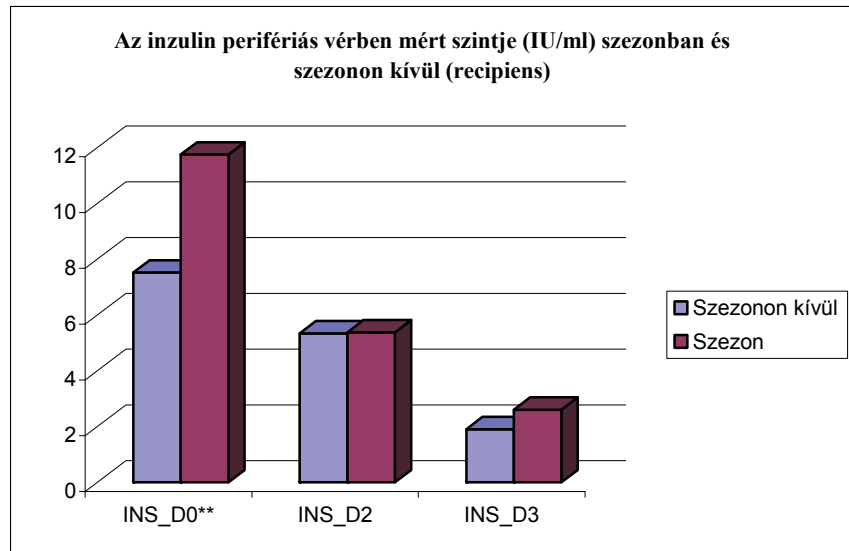
40. ábra



41. ábra



42. ábra



5. Az eredmények megbeszélése és az azokból levonható következtetések

5.1. Az embrió transzfer programok

Összesen négy, 2 szezonon belüli (február) és 2 szezonon kívüli (április) EÁ programot fejeztünk be két év leforgása alatt (2009. és 2010.).

Saját vizsgálati eredményeink értékelésénél, a már korábban említett okok miatt, (takarmányozási anomália miatt nem optimális tápanyagellátás- a 2009-es és 2010-es év vérmintáinak metabolikus paramétereiben tapasztalt szignifikáns különbségek) nem tudtuk bevonni a 2009. áprilisi eredményeket a statisztikai értékelésbe, mivel azok nagy mértékben torzították volna az elemzés végeredményét. (A 15. táblázat 2009. áprilisi eredményeit megvizsgálva ez a döntésünk helytálló, hiszen a program eredményei minden tekintetben elmaradnak a szezonon belüli, de még a másik /2010. április/ szezonon kívüli programtól is.)

1. A 2009. és 2010. évi szezonon belüli, valamint a 2010. évi szezonon kívüli vizsgálatokat összehasonlítva egymással, nem találtunk szignifikáns különbséget a kinyert embriók, a beültetésre alkalmas embriók, és az átlagos donoronkénti CL szám esetében sem (ld. 15. táblázat). Összességében tehát elmondható, hogy esetünkben nem befolyásolta az embrióátültető program eredményességét (a donorok esetében), hogy szezonon belül, vagy azon kívüli időszakban történt-e a donorok szuperovulációs kezelése. RYAN és mtsai (1991) is leszögezik, hogy a szezonnak nincs feltétlenül hatása a sárgatestszámmra, de a sárgatestsám és ún. „nagy follikulusok” számát tekintve már szignifikáns különbség van a szezonon belüli és azon kívüli időszakban az előbbi javára merinó fajtájú juhok esetében.

A fentiekkel ellentétben CUETO és mtsai (2011) és RYAN és msai (1991) szerint a szezonon belüli időszakban elvégzett szuperovulációs kezelés magasabb kimosott embrió és termékenyült petesejt számot eredményez, így javítva az EÁ program eredményességét.

Hasonló eredményről számol be AMIRIDIS és CSEH (2012) is, miszerint a szezon fontos külső befolyásoló tényezője a szuperovuláció sikerének.

A következő táblázatban a donorok embriókinyerési eredményei mellett az egyes programok recipiens anyajuhainak eredményei is láthatóak.

15. táblázat: A donorok és recipiensek átlagos, összefoglaló eredményei programonként

	Kinyert embriók száma/donor (db)	Beültetésre alkalmas embriók száma/donor (db)	CL szám/donor (db)	Összes recipiens/ellett recipiensek száma (%)	Implantációs arány (%)*
2009. február	8	7,57	9	8/5 (62,5)	48
2009. április	2,3	0	4,5	6/0 (0)	0
2010. február	7,8	6,4	8,2	12/8 (66,6)	34
2010. április	11	7,3	13,16	12/7 (54)	27

* megszületett bérány/recipiensekbe beültetett embrió

Szuperovulációs kezelést követően a donoronkénti CL számot egyes szerzők 5-15-ben állapítják meg (HILD-PETITO és mtsai, 1987; JABLONKA-SHARIFF és mtsai, 1993; GONZALES-BULNES és mtsai, 2004), míg WINDORSKI és mtsai (2007) vizsgálatai alapján ez az érték 5-52 CL között változik anyajuhonként. CSEH és mtsai (1986) merinó fajtájú donorok esetében az átlagos sárgatestszámot 8,6, míg az átlagosan kinyert embriók számát 7,1-nek írták le. Saját vizsgálatainkban az anyajuhonkénti sárgatestszám (azokat az állatokat figyelembe véve, amelyek reagáltak a szuperovulációs kezelésre) 1 és 20 között volt. A sárgatestek száma átlagosan programonként, szezont és a szeznon kívüli időszakot külön-külön figyelembe véve, 4,5 és 13,16 között változott.

2. A recipiensek esetében a két szeznon belüli program eredményei bérányozási arányt és megszületett bérány/beültetett embriót tekintve is hasonlóak, nincs közöttük szignifikáns eltérés. A szeznon kívüli, 2010. áprilisi program mindkét, fent említett paraméter esetében elmarad a szeznon belüli eredményektől (ld. 15. táblázat).

Ennek a magyarázata lehet a szezonon kívüli időszak, amely az adatok szerint befolyásolta a merinó fajtájú recipiensek vemhesülését, illetve a recipiensek perifériás vérében mért metabolikus hormonszintek különbségei szezonon belüli és azon kívüli időszakban. A donorok esetében nem volt befolyásoló tényező, hogy februárban vagy áprilisban történt a szuperovulációs kezelés, ugyanakkor recipiensek esetében a vemhesülést befolyásolta a szezon (azonban az általunk használt statisztikai módszerekkel szignifikanciát ($P \leq 0.1$ vagy $P \leq 0.05$) nem sikerült kimutatni, ez csak tendenciaként említhető).

5.2. A 2009. és 2010. áprilisi program anyagforgalmi paramétereinek vizsgálati eredményei I. - Donor anyajuhok (megbeszélés és következtetések)

A metabolikus paraméterekkel kapcsolatos vizsgálatokban elsőként összehasonlítottuk a két vizsgált évben, 2009-ben és 2010-ben a szezonon kívüli program (április) donor anyajuhainak vérmintáit. Meghatároztuk az állatok energetikai státuszát jól reprezentáló béta-hidroxi-vajsav (BHB), nem észterifikált zsírsavak (NEFA), koleszterol, karbamid, aszpartát-aminotranszferáz (AST/GOT) és összfehérje (TP) perifériás vérben mért szintjét.

Kérődzőkben a negatív energia egyensúly (NEB; Negatív Energia Balansz) egyértelmű változásokat okoz a szérumban, ilyenkor magas NEFA és BHB, valamint alacsony glükóz koncentrációt találunk (HERDT, 2000). A glükoneogenezishez szükséges magas aminosav metabolizmus miatt a karbamid szint is emelkedik a NEB következményeként (SINCLAIR és mtsai, 2000). A negatív energiamérleg történései közvetlenül hatnak a tüszőre és benne a petesejtre, amely egy abnormális oocita ovulációjához vezet/vezethet majd (LEROY és mtsai, 2008).

1. A **BHB** perifériás vérben mért szintje a D0 napon, tehát a donorok mesterséges termékenyítésének napján 2009-ben szignifikánsan magasabb volt, mint a 2010-es évben, viszont ezt a különbséget sem a D2, sem a D3 mintavételi napon nem sikerült kimutatni. Az értékek mindig az élettani tartományon belül voltak (RADOSTITS és mtsai, 2007). Mivel a mesterséges termékenyítés előtt az állatok már éheztetett állapotban voltak, elképzelhető, hogy 2009-ben a D0 napon a magasabb BHB szint oka

az állatok energiatartalékainak hiánya, és ez a különbség a D2 napra, amikor az állatok takarmányhoz jutottak, eltűnt.

2. A **NEFA** értékek 2009-ben a D0 napon szignifikánsan alacsonyabbnak bizonyultak, és a további mintavételi napokon ugyanaz a tendencia figyelhető meg, mint a BHB esetében. Az eredmény teljesen ellentmond annak a ténynek, hogy a vérszérum megemelkedett NEFA értékei mögött mindig lipid metabolizáció és energiahiány áll (DRACKLEY és mtsai, 2001). A BHB értékeivel tehát jól magyarázható a 2009-es relatív energia hiánya a donor anyajuhoknál, de a NEFA esetében nincs magyarázatunk arra, hogy miért magasabbak az értékek 2010-ben. Ugyanakkor tudjuk, hogy a 2010-es év áprilisi programjában a született bérány/beültetett embrió arány nagyon alacsony volt a recipienseknél a többi programhoz képest. Ennek a jelenségnek teoretikusan magyarázata lehet az, hogy az emelkedett NEFA értékek összefüggésbe hozhatók a korai embrionális mortalitással kórödzökben (SENOSY és mtsai, 2012).

3. A **koleszterol** értékei mindhárom mintavételi napon szignifikánsan magasabbnak bizonyultak 2010-ben, mint 2009-ben, ami egyértelműen a 2010-es év jobb energiaellátottságának köszönhető. A szignifikáns különbséget az éheztetés sem változtatta meg.

4. A **karbamid** esetében szintén mind a három mintavételi napon jól látható, hogy szignifikáns különbség van a két év között, mégpedig a 2009-es évben emelkedett karbamid értékeket mutattak a programban részt vevő állatok. A 2009-es év áprilisában elvégzett EÁ program negatív eredményének egyik oka lehet, hogy az emelkedett karbamid szint hátrányosan befolyásolta a reprodukciós teljesítményt (MARONGIU és mtsai, 2009).

5. A **TP** perifériás vérben mért szintje 2009-ben mindhárom mintavételi napon szignifikánsan alacsonyabb volt, mint 2010-ben. A TP a koleszterolhoz hasonlóan egyértelműen tükrözi az állatok energiaellátottságának szintjét.

6. Míg az eddig említett paraméterek mind az élettani értékeken belül voltak, az **AST** esetében mindkét évben az élettani határértéken felüli eredményeket kaptunk. Ez azt jelenti, hogy a donor állatok bizonyos fokú (de már nem csak szubklinikai)

májkárosodásban szenvedtek mindkét vizsgált évben, amely valószínűleg kihathatott az EÁ programban mutatott reprodukciós teljesítményükre és hormonszintjükre is (ld. 5.3.)

Összességében tehát a két vizsgált év (2009. és 2010.) embrióátültető programjaiban részt vevő állatok vérmintáit összehasonlítva: egyértelműen látszik a BHB, karbamid, TP és koleszterol értékekből, hogy az állatok 2009-ben egy ún. relatív energia hiányban szenvedtek, ami ugyan klinikai tünetekben még nem nyilvánult meg, de elegendőnek bizonyult ahhoz, hogy alapvetően befolyásolja a 2009-es program eredményét (kinyert és beültetésre alkalmas embriók száma, vemhesülés). Ezt a helyzetet „súlyosbította” az a vélhetően már nem szubklinikai szintű májkárosodás, ami az emelkedett AST értékekből vált nyilvánvalóvá. Az AST emelkedett szintje nagyon jól jelzi már a szubklinikai májkárosodást is (MEYER és HARVEY, 1998), de az enzim emelkedésének esetleges reprodukciós következményéről még nincs irodalmi adat (ld.: 5.3.).

5.3. A 2009. és 2010. áprilisi program anyagforgalmi paramétereinek vizsgálati eredményei II. - Donor anyajuhok (megbeszélés és következtetések)

Vizsgálataink során azt is elemeztük, hogy az anyagforgalmi paraméterek alakulása hogyan befolyásolja az EÁ programok sikerét. A két évet nem egymással hasonlítottuk össze, hanem a két program donor állatait egy csoportként kezeltük, figyelmen kívül hagyva azt, hogy 2009-ben vagy 2010-ben történt-e a program. Azt elemeztük, hogy bizonyos tápanyag-függő metabolitok (BHB, NEFA, AST, karbamid, koleszterol, TP) vérben mért szintje hogyan befolyásolja a vér progesteron szintjét, a donorok szuperovulációra adott válaszreakcióját, a donoronkénti sárgatestek, kimosott és beültetésre alkalmas embriók számát, tehát összességében az EÁ program eredményességét.

A másik megközelítési lehetőség, hogy vajon milyen nutritív háttérrel rendelkeznek az egyes donor anyajuhok, ha a szuperovulációjuk a korábban említett mértékben eltér egymástól.

LOZANO és mtsai (2000), O'CALLAGHAN és mtsai (2000), JABBOUR és mtsai (1991) és ABECIA és mtsai (1997) is leírták, hogy az alultápláltságnak beláthatatlan következményei lehetnek egy embrióátültetési program során. Másrésről

a szuperovuláció egy kifejezetten „érzékeny” pontja, „gyenge láncszeme” az embrióátültetési programnak, minden állatfajban, így a juhban is.

Bár a hormonkészítmények tisztasága mára nagymértékben javult, azonban még ma is a kb. 30-40 évvel ezelőtt kifejlesztett protokollt alkalmazzák. Az állatok mintegy 30%-a reagál rossz (1-4 embrió), 30%-a jó (5-10 embrió) és 10%-a reagál rekord embriótermeléssel (>10 embrió) a kezelésre, míg 30%-nál semmilyen válaszreakció nincs (CSEH és DOHY, 2003; AMIRIDIS és CSEH, 2012).

Kísérletünkben az anyajuhok 16%-a (2/12) egyáltalán nem reagált a kezelésre, 33% reagált rosszul (4/12). Ugyancsak 33% produkált jó embriótermelést (5-10 embrió), míg az anyajuhok 16%-a válaszolt rekord embriótermeléssel (>10 embrió) a szuperovulációs kezelésre. Az egyik donorból 5 db ötsejtes embriót sikerült kinyernünk, amelyeket ugyan beültettünk recipiensekbe, de a fejlődésben való lemaradásuk miatt természetesen nem vártunk vemhesülést.

COGNIE és mtsai (2003) szerint a szuperovulációs kezeléshez használt készítmények tisztaságának javulása és a programozott mesterséges termékenyítés ellenére sem küszöbölhető ki ez a hatalmas variabilitás a szuperovuláció eredményességében.

Az előbbieket alapján kijelenthető, hogy ugyan minden donor anyajuh esetében megegyezett a fajta, a kor, a tartás és takarmányozás, a szezonon kívüli időszak és a kezelési protokoll is, hatalmas különbségek figyelhetők meg a szuperovulációs válaszreakciót illetően, amely összefüggésben lehet bizonyos tápanyagfüggő metabolitok perifériás vérben mért szintjével.

Az általunk vizsgált paraméterek, (BHB, NEFA, TP, karbamid, koleszterol) valós képet adnak az állatok nutritív státuszáról, a hatodik vizsgált elem, az AST pedig egy olyan enzim, ami a máj károsodásának mértékéről tájékoztat. Az előző fejezetben már említésre került, hogy kérődzőkben a hiányos takarmányellátás milyen változásokat okoz a szérumban (HERDT, 2000; SINCLAIR és mtsai, 2000), és hogy ez milyen következményekkel jár a tüszőre és a petesejtre nézve (LEROY és mtsai, 2008).

1. A **BHB** perifériás vérben mért szintje összefüggésben van a az állatok energetikai státuszával, és befolyással lehet a reprodukciós teljesítményre is (KULCSÁR és mtsai, 2006; AL-QUDAH, 2011). A donor anyajuhok BHB átlageredményei (D0 napon 0,355,

a D2- n 0,1875, a D3 napon pedig 0,2708 mmol/l) nagyon jól reflektálnak a mintavételi napokhoz kapcsolódó eseményekre.

A D0 napon, a mesterséges termékenyítés napján az anyajuhok éheztetett állapotban voltak, amelyet a viszonylag magas értékek jól jeleznek. Ez az érték a D2 napra alacsonyabb lesz (etetés), majd a következő éheztetési periódusban (az embriómosás idejében) a D3 napon újra megemelkedik.

A várakozásainkkal ellentétben, miszerint a magasabb BHB szintek kapcsolatban lesznek a CL számmal, az embriók számával (SENOSY és mtsai, 2012; MAILLO és mtsai, 2012), nem tudunk szignifikáns összefüggést kimutatni a BHB és a fent említett paraméterek esetében. Ennek oka az lehet, hogy a ketontestek perifériás vérben mért szintjének ilyen alacsony szintű és rövid távú változása még nem befolyásolta az EÁ program eredményességét. A BHB D0 napi perifériás vérben mért szintje ugyanakkor szignifikáns pozitív összefüggést mutatott a progeszteron D3 napi szintjével (amely jelenségre eddigi ismereteink szerint nincs logikus magyarázat).

2. A NEFA átlageredményei 0,205, 0,06915, 0,1325 mmol/l a D0, D2 és D3 napokon. Ez alátámasztja a LEROY és mtsai (2008) által publikált eredményeket, miszerint a negatív energiamérleg esetében a tüszőfolyadék és a perifériás vér NEFA szintje megemelkedik.

Szignifikáns pozitív az összefüggés a NEFA D0, D2 és D3 napokon mért értékei és a kimosott embriók száma, valamint a NEFA D3 napi értéke és az átültetésre alkalmas embriók száma között. Ebben az esetben is éppen az eredmények ellenkezőjére számítottunk, miszerint a NEFA szint emelkedése negatív hatással lesz az embriószámra és a CL számra, mint azt több irodalmi forrás is állítja (VAN HOECK és mtsai, 2011; SENOSY és mtsai, 2012; OBA és mtsai, 2013)- a magyarázathoz további, nagyobb állatlétszámon elvégzett vizsgálatok szükségesek.

3. PRADHAN és mtsai (2008) által már bizonyítást nyert, hogy az ellés után szuperovuláltatott japán fekete tehének átültetésre alkalmas embriószáma szignifikáns pozitív összefüggést mutat a perifériás vér **koleszterol** koncentrációjával, de a koleszterol és a donor anyajuhok szuperovulációja közötti összefüggéseket eddig még nem írtak le.

A donor anyajuhok koleszterol értékei (D0 és D3 napokon, ld. eredmények) pozitív összefüggést mutatnak a CL számmal. Ugyancsak szignifikáns pozitív az összefüggés a

D0, D2 és D3 napi koleszterol értékek és a kimosott embriók száma között, valamint a D0 és D2 napi koleszterol értékek és az átültetésre alkalmas embriók száma között. Mindez alátámaszja a fenti eredményeket, miszerint a koleszterol perifériás vérszintje alapvetően befolyásolja a sárgatest és az embriószámot is egy juh EÁ program során!!

4. Az **AST** elsősorban a máj parenchyma sejtjeiben található enzim, amely megtalálható egyéb szervekben is (szív és harántcsíkolt izomzat, vese, agy és vörösvérsejtek). A klinikai diagnosztikában a májfunkció nyomonkövetésére használják. Előzetes várakozásainknak megfelelően az AST D2 napi értékei (a mesterséges termékenyítés utáni napok) szignifikáns negatív összefüggést mutatnak a sárgatestszámmal, a kinyert embriók számával, valamint a perifériás vér progeszteron koncentrációjával. Ez azt jelenti, hogy juhok esetében az AST emelkedett vérben mért szintje erős negatív hatással van a reprodukciós teljesítményre egy embrióátültető program során. Nemcsak közvetlenül a CL és az embriószámot befolyásolja, hanem a P4 perifériás vérben mért szintjének csökkentésén keresztül is hat. Ezt az összefüggést kérődzők esetében még nem írták le.

5. A plazmában és a tejben található magas **karbamid** koncentrációk felelősek a tejelő tehenek csökkent fertilitásáért (BUTLER és mtsai, 1996), a méh nyálkahártya megváltozott környezetének köszönhetően (ELROD és BUTLER, 1993). Ugyanakkor FAHEY és mtsai (1998) arról publikáltak, hogy a magas karbamid koncentrációnak nem volt hatása a donor és recipiens anyajuhok ovulációs rátájára.

Juhok esetében sikerült bizonyítanunk, hogy a D0 napi karbamid perifériás vérben mért szintje szignifikáns negatív összefüggést mutat a sárgatestszámmal, a kinyert és átültetésre alkalmas embriók számával is, tehát nagy befolyással bír az EÁ program eredményességére.

6. A vérplazma összes fehérjetartalma (**TP**) esetében nem találtunk összefüggést a TP értékek és az EÁ program eredményessége (reprodukciós teljesítmény) között, annak ellenére, hogy kérődzőkben már feltártak ezzel kapcsolatos összefüggéseket (WALSH és mtsai, 2012).

A fent bemutatott eredmények és összefüggések alapján kijelenthetjük, hogy bizonyos metabolikus paraméterek perifériás vérben mért szintje összefüggésben

van/összefüggésbe hozható a juh embrióátültetések eredményességével. Ez a megállapítás azért nagyon jelentős, mert az AST kivételével a fent vázolt paraméterek mindegyike az élettani tartományon belül volt, az élettani tartományon belüli értékek elhelyezkedése mégis nagy mértékben befolyásolta azt, hogy egy donor anyajuh hogyan reagál a szuperovulációs kezelésre. Az ún. „relatív energia hiány” még semmilyen klinikai tünetben nem jelentkezett, de elegendő ahhoz, hogy azt a kényes hormonális és reprodukciós egyensúlyt, amely a közepes- jó vagy rekord embriótermeléshez szükséges, megbontsa. Sikerült bizonyítani továbbá, hogy a korábban leírt metabolikus paraméterek milyen hatással bírnak juh embrióátültető program során a sárgatestszámra, kinyert és átültetésre alkalmas embriók számára egyaránt.

5.4. A metabolikus hormonok vizsgálati eredményei (megbeszélés és következtetések)

1. A **2009.** februári program elemzése során a recipiens anyajuhok esetében szignifikáns összefüggést sikerült kimutatnunk a vemhesség és a perifériás vér **T4** szintje között. A vemhes anyajuhokban alacsonyabb volt a D0 napi tiroxin koncentráció. Ez az eredmény ellentétes TODINI és mtsai (2007) megállapításával, amely szerint a vemhesség alatt megemelkedik a T3 és T4 perifériás vérben mért szintje.

A pajzsmirigyhormonok juh embrióátültetésre kifejtett hatásáról még nem közöltek tudományos eredményeket.

Kísérleteinkben megállapítottuk, hogy a T4 perifériás vérben mért szintje a D0 és D2 napon is szignifikáns negatív összefüggést mutat a kinyert embriók számával és a CL számmal is donor anyajuhok esetében. További vizsgálatokat igényel ezen eredmények pontos magyarázata, hiszen nem egyértelmű, hogy az anyajuhok megváltozott fiziológiai állapota hatott-e a pajzsmirigyhormonok perifériás vérben mért szintjére, vagy fordítva. Az ezirányú kísérleteket nagyobb számú állaton és több ismétlésben elvégezve juthatunk közelebb a kérdés megválaszolásához.

A jelenség egy lehetséges magyarázata lehet, hogy azok az anyajuhok, amelyek a szuperovulációs kezelés előtt/alatt alacsonyabb tiroxin szinttel bírtak, alacsonyabb alap metabolikus szinttel rendelkeztek, ami kedvező hatással volt az embrió és a CL számra.

A **2010.** februári programban nem találtunk kapcsolatot a perifériás vér **T4** szintje és a recipiens anyajuhok vemhesülése között.

A 2010-es vizsgálatok nem, de *az összevont eredmények statisztikai analízise megerősítette, hogy a T4 perifériás vérben mért szintje a D2 napon szignifikáns negatív összefüggést mutat a kinyert embriók számával és a CL számmal is donor anyajuhok esetében.*

2. Mint azt már korábban bemutattuk, a perifériás vér **P4** szintje alapvető szerepet játszik a korai embrionális fejlődésben, az implantációban és a vemhesség fenntartásában. A 2009-es év februári programjában a donor anyajuhok esetében szignifikáns pozitív összefüggést találtunk a kinyert embriók száma és a progeszteron D2 és D3 napi perifériás vérben mért szintje között, ami megegyezik REMSEN (1982) szarvasmarhákban megfigyelt eredményeivel, miszerint az embriók túlélési aránya a plazma P4 koncentrációjának emelkedésével nő. Ezt az összefüggést donor anyajuhok esetében még nem tárták fel, ugyanakkor számos eredményt közöltek már a recipiens anyajuhok P4 szintje és az ET programok eredményességével kapcsolatban (ASHWORTH és mtsai, 1989; BARI és mtsai, 2002).

A donor anyajuhok sárgatestszáma is szignifikáns pozitív összefüggést mutat a P4 D3 napi szintjével.

A 2010. februári program donor állataiban a kimosott embriók és a sárgatestek száma szignifikáns pozitív összefüggést mutat a **P4** D0 és D3 napi perifériás vérben mért szintjével, amely eredmények egyeznek a 2009-es vizsgálatokkal, valamint *a két évet összevontan vizsgálva is megerősítettük ezt az eredményt* (megjegyzendő ugyanakkor, hogy az összevont vizsgálatokban a kimosott embriók és a sárgatestek száma a progeszteron D2 és D3 napi perifériás vérben mért szintjével korrelál pozitívan).

A **2010. áprilisi** (szezonon kívüli) program eredményei a **P4** esetében egyeznek a szezonon belüli összevont vizsgálatok eredményeivel, miszerint a P4 szintje pozitívan korrelál a sárgatestszámmal a D2 és D3 napon is.

3. Az **IGF-1** fontos mediátora a follikulogenezisnek, szteroidogenezisnek, az oocyta érésének és az embriófejlődésnek (GONG és mtsai, 1993a; GONG és mtsai, 1993b; GONG és mtsai, 1994; TOTEY és mtsai, 1996). A donor anyajuhok IGF-1 perifériás vérben mért szintje 2009-ben szignifikáns pozitív összefüggést mutatott a kinyert embriók számával. Hasonló eredményekről számolnak be VELAZQUEZ és mtsai 2005-ben, miszerint donor tehének esetében az embriószám és a vér IGF-1 szintje között

pozitív a korreláció. Ugyanakkor donor üszők esetében az átültetésre alkalmas embriók aránya negatívan korrelál az IGF-1 szinttel. A szakirodalmi források adatai szerint általános jelenség, hogy sokszor ellentétesek az összefüggések az IGF-1 szintje és az embriószám között, mint ahogyan azt BLOCK (2007) is leszögezi, miszerint az IGF-1 embrió túlélésre és fejlődésre kifejtett hatása az endogén környezet stimulusainak függvényében pozitív és negatív is lehet.

Az **IGF-1** perifériás vérben mért szintje 2009-ben tehát szignifikáns pozitív összefüggést mutatott a kinyert embriók számával. Ezt a további vizsgálatok azonban nem támasztották alá, sőt, 2010-ben azt tapasztaltuk, hogy az IGF-1 perifériás vérben mért szintje szignifikáns negatív összefüggést mutat a kinyert embriók számával, és a CL számmal. Esetünkben tehát BLOCK (2007) megállapítása helytálló, miszerint az IGF-1 embrió túlélésre és fejlődésre kifejtett hatása az endogén környezet stimulusainak függvényében pozitív és negatív is lehet.

*A donor állatok összevont eredményeiben továbbá az **IGF-1** D0-D2, valamint az IGF-1 D0-D3 napi perifériás vérben mért szintjének változása szignifikáns pozitív összefüggést mutat a kinyert embriók, és a donorok petefészkeiben levő sárgatestek számával. Tehát minél inkább lecsökkent a vérvételi időpontok között az IGF-1 értéke, annál több CL és kigyújtott embrió volt az eredmény donoronként. Mindez alátámasztja a fenti (2010-es) eredményeket, melyek az IGF-1 szint negatív hatását mutatják az embrió túléléssel és fejlődéssel kapcsolatban.*

Az eredmények értékeléséhez, és az IGF-1-gyel kapcsolatban felmerülő kérdések pontos magyarázatához még további, nagyobb állatlétszámmal elvégzett kísérletek szükségesek.

4. Szignifikáns pozitív összefüggést fedeztünk fel a recipiensek vemhesülése és a perifériás vér D0 és D2 napi **inzulin** szintje között a 2010. februári programban. Az inzulin juh embrióátültető programok eredményességét befolyásoló szerepe még ismeretlen, és eddig nem tanulmányozott terület, mindamelllett, hogy az egyedek közötti IGF-1 és inzulin koncentrációbeli különbségek elegendőek lehetnek ahhoz, hogy eltéréseket okozzanak a folliculusok fejlődésében, az azonos FSH szint ellenére (GONG és mtsai, 2002).

Annak ismeretében, hogy az IGF-1 perifériás vérben mért szintjével párhuzamosan változik az inzulin szintje is (VELAZQUEZ és mtsai, 2005), és a fentiekben már

említésre került az IGF-1 reprodukcióra gyakorolt hatása, talán megmagyarázható, hogy miért hat jótékonyan az embrió megtapadására recipiensekben az inzulin emelkedett szintje. Az inzulin petefészek működést serkentő (SARATH és mtsai, 2008) és LH szintre gyakorolt hatásával (DOWNING és SCARAMUZZI, 1997) kapcsolatban már közöltek eredményeket.

A 2009-es és a 2010-es év szezonon belüli időszak adatait összevontan vizsgálva az inzulinnal és a recipiensekkel kapcsolatos összefüggést megerősítettük (szignifikáns pozitív összefüggés a vemhesülés és a vér inzulin szintje között).

2010. áprilisában azonban egy olyan összefüggés is megjelent, amely a szezonon belüli vizsgálatokban nem, mégpedig szignifikáns pozitív összefüggést találtunk a CL szám és az **inzulin** D3 napi értéke között. Sajnos a fenti összefüggéseket nagyobb elemszámmal, a 2009-es szezonon kívüli program eredményeinek bevonásával nem támaszthattuk alá a már korábban említettek miatt.

A szezonon belüli és szezonon kívüli időszak összehasonlítása

Kísérletsorozatunk kezdetekor azt feltételeztük, hogy a magyar merinó fajtájú anyajuhok (szezonális fajta lévén) eltérően reagálnak majd a kezelésekre szezonon belül és azon kívül, amely végső soron az EÁ program eredményességét is befolyásolja majd (metabolikus hormonok eltérő szintje).

A szezonon belüli és azon kívüli időszak összehasonlításakor több metabolikus hormon esetében tapasztaltunk szezonális ingadozást. CHILLARD és mtsai (1998) valamint CHEMINEAU és mtsai (2008) megállapították, hogy bizonyos metabolikus hormonok perifériás vérben mért szintje évszakonkénti ingadozást mutat, amely kiskérődzőkben részben magyarázatot adhat a szaporodóképesség szezonálisára is. Az általunk vizsgált metabolikus hormonok szezonon belüli és azon kívüli szintjének, illetve az EÁ program eredményességének kapcsolatáról azonban nem jelent még meg tudományos közlemény.

1. Saját vizsgálataink azt mutatják, hogy donor állatokban az **IGF-1**, recipiens állatokban az **IGF-1** és az **inzulin** alap (D0 napi) szintje szignifikánsan különbözik februárban és áprilisban. Donor anyajuhokban az áprilisi IGF-1 alapszint, míg recipiensekben a februári IGF-1 és inzulin szintek bizonyultak magasabbnak.

Donoroknál a magasabb áprilisi IGF-1 szintek (számszerűen) jobb (de statisztikailag nem igazolható) eredményeket hoztak a CL szám, és az átlagos kinyert embriószám esetében is.

Recipienseknél a februárban mért magasabb IGF-1 és inzulin szint lehet a magyarázata a jobb bárányozási aránynak és a megszületett bárány/beültetett embrió aránynak is. Ebben az esetben az IGF-1 alapszintje pozitívan hat a reprodukciós teljesítményre (ellentétben a korábban leírt eredményekkel, amelyek az IGF-1 perifériás vérben mért szintjének negatív hatását mutatják az embrió túléléssel és fejlődéssel kapcsolatban - a D2 és D3 napokon).

2. Számos kutató észlelt szezonális eltéréseket a **pajzsmirigyhormonok** perifériás vérben mért szintjében, amely elsősorban olyan, szabadon tartott és legelő állatokban jelentős, mint pl.: a kecske (TODINI és mtsai, 1992) és a juh (SOUZA és mtsai, 2002). Ezek a szezonális hormonkoncentrációbeli változások teszik lehetővé az állatok számára, hogy minden esetben alkalmazkodni tudjanak a megváltozott környezeti feltételekhez, tápanyagellátáshoz, és a különböző fiziológiai állapotokhoz.

Eredményeink a pajzsmirigyhormonok szezonális ingadozásával kapcsolatban a következők: donor anyajuhok esetében a T3 alap (D0 napi) és D3 napi szintje áprilisban szignifikánsan magasabb értékeket mutat, mint februárban. Áprilisban magasabb a T4 értéke is, de ez csak tendenciaként említhető.

Recipiensek esetében a T3 D3 napi vérben mért szintje szintén áprilisban mutat szignifikáns emelkedést februárhoz képest. Tehát a pajzsmirigyhormonok magasabb perifériás vérben mért szintje jelen esetben csak a recipiens állatokban hozható összefüggésbe a reprodukciós teljesítménnyel. (A donor anyajuhok szezonon belüli és azon kívüli eredményei között nem volt kimutatható különbség, a recipienseknél pedig a fentiek alapján a T3 negatív hatása érvényesült a vemhesülésre.)

3. A **progeszteron** esetében csak recipienseknél találtunk szignifikáns összefüggéseket. A P4 alap (D0 napi) szintje szignifikánsan magasabb szezonon kívül, annak ellenére, hogy a recipiens anyajuhok EÁ programbeli teljesítménye februárban volt jobb (de a D2 és D3 napi P4 szint magasabb szezonon belül). KAULFUSS és mtsai (2006) a német merinót (=magyar merinó) igen szezonális fajtaként említi, a tenyésztésidőszakban kimutathatóan magasabb perifériás P4 értékekkel.

A metabolikus hormonok perifériás vérben mért szintjében tehát szezonon belül és azon kívül szignifikáns különbségek tapasztalhatóak. Ezek az eredmények összefüggésbe hozhatóak a donor illetve recipiens anyajuhok reprodukciós teljesítményével, azonban bizonyos jelenségek pontos magyarázatához (pl.: donorok és recipiensek között tapasztalt hormonszint különbségek oka) még további vizsgálatok szükségesek.

5.5. A vizsgált metabolitok és metabolikus hormonok lehetséges diagnosztikai/prognosztikai szerepe

Az évtizedek óta tartó kutatások és eddigi eredmények ellenére juh fajban a szuperovulációs hormonkezelésre kapott petefészek válasz minősége megjósolhatatlan és teljesen kiszámíthatatlan. Számos belső (fajta, a petefészken található follikulusok állapota, stb.) és külső (hormonkezelés, takarmányozás, szezon/évszak, alkalmazott gonadotrop hormon és annak tisztasága) tényező befolyásolhatja az eredményességet. Mindezek mellett számos ismert faktor (fajta, szezon, sárgatestek száma, állapota és P4 termelése, takarmányozás stb.) lehet hatással a recipiens anyajuhok vemhesülésére is.

A juh EÁ programok szélesebb körben való bevezetését szolgálhatná az, ha már a beavatkozások megkezdése előtt megállapítható lenne egy donor/recipiens állatról az embrióátültetésre való alkalmassága. Így elkerülhetővé válik az esetleg feleslegesen elvégzett drága hormonkezelés.

Vizsgálatainkban több metabolikus faktorról és hormonnál bizonyítottuk, hogy alapvető szerepet játszanak az EÁ programok kimenetelében.

A fenti eredmények alapján kijelenthetjük, hogy a program előtt egy egyszerű vérvizsgálatot végezve megállapítható, hogy a kiválasztott donor/recipiens perifériás vérében milyen értékekkel bírnak a metabolikus paraméterek (amelyek élettani határértéken belüli elhelyezkedése is hat a reprodukciós teljesítményre).

Recipiens állatoknál pedig (a metabolikus hormonok közül) az inzulin perifériás vérben mért szintje már az embrióátültetés előtt (D0 minta) jelzi az embrió megtapadásának valószínűségét.

Ezek az eredmények hatalmas diagnosztikai/prognosztikai szereppel bírnak/bírhatnak, ugyanakkor további vizsgálatokat (nagyobb elemszám) igényel a részletek pontosabb kidolgozása.

6. Új tudományos eredmények

1. A merinó juhok szuperovuláltatás utáni embrió donorként való használata szezonban és szezonon kívül egyaránt jó eredményt ad, míg a fajta egyedének recipiensként való alkalmazása esetén a vemhesülési arány és a megszületett bárányok aránya elmarad a várt szinttől, és értékeiket a szezon jelentős mértékben befolyásolja. Ezért embrió átültetési programban való használata kevésbé javasolható.

2. Juh fajban bizonyos metabolikus paraméterek (BHB, karbamid, TP és koleszterol) akkor is befolyásolják azt a kényes hormonális és reprodukciós egyensúlyt, amely a közepes- jó vagy rekord embriótermeléshez szükséges, ha azok az élettani határértékeken belül helyezkednek el.

3. Az AST májterhelésre utaló emelkedett szintje erős negatív hatással van a szaporodási teljesítményre, mert csökkenti a sárgatest és a beültetésre alkalmas embrió számot, valamint csökkenti a P4 perifériás vérben kimutatható értékét is.

4. A merinók EÁ-ben való használatakor számítani kell több metabolikus hormon (IGF-1, inzulin, T3, T4) szezonális ingadozására, ami jelentősen befolyásolja a donorok embriótermelését és a recipiensek vemhesülését is. Donor anyajuhok esetében a T4 értéke negatívan befolyásolja a kinyert embriók és a sárgatestek számát. A tiroxin perifériás vérben kimutatható szintje negatívan, míg az inzulin értéke pozitívan befolyásolja a recipiensek vemhesülési értékét.

7. Az eredmények gyakorlati hasznosíthatósága

A magyar állattenyésztés, és ezen belül a juhtenyésztés fejlesztése a 21. században már nem képzelhető el asszisztált reprodukciós eljárások alkalmazása nélkül. Ezen eljárások közül sem az üzemi körülmények között legegyszerűbben alkalmazható mesterséges termékenyítés, sem a bonyolultabb embrióátültetés vagy embriókinyerés nem terjedt el a gyakorlatban. A tenyésztők "érdektelenségének" okaként számos dolog sorolható fel (pl.: nagyobb munkaigény, többletköltségek), mégis az egyik legfontosabb az, hogy az említett eljárások alapját képező szuperovuláció eredményessége még mindig eléggé kiszámíthatatlan. A költséges műveletek ellenére nem lehet előre megjósolni, hogy egy adott donor vagy recipiens anyajuh hogyan fog szerepelni a programban. Számos faktorról (pl.: évszak, fajta, takarmányozás, kezelési protokoll...stb.) tudjuk, hogy befolyásolják a programok kimenetelét, ennek ellenére ismeretanyagunk továbbra is hiányos az eredményességet befolyásoló tényezőket illetően.

A PhD disszertációban több olyan, eddig nem publikált tudományos eredményt ismertettem, amely a juh szaporodásbiológia, ezen belül a szuperovuláció élettanának jobb megismerését teszi lehetővé:

1. Két szezonon belüli (február), és két azon kívüli (április) EÁ program után megállapítottuk, hogy a magyar merinó fajta anyajuhai donorként kiváló teljesítményt nyújtanak szezonon belül és azon kívül is, a szuperovuláció eredményességét (*sárgatestek, kimosott és átültetésre alkalmas embriók száma és minősége*) esetükben tehát nem befolyásolja a szezon. Recipiensként azonban, *bárányozási arány és megszületett bárány/beültetett embrió* esetében is elmaradtak a szezonon kívüli programok, a szezonon belülitől. A hazánkban legelterjedtebb magyar merinó fajtát tehát donorként javasolhatjuk egy EÁ programban szezontól függetlenül, recipiensként azonban más fajta használata javasolt (amely vemhesülését nem befolyásolja ennyire a szezon).

2. Kérődzők esetében az optimális takarmányozás reprodukcióban és az EÁ programokban betöltött szerepe már évtizedek óta ismert. Arra azonban eddig nem derült fény, hogy az az érzékeny egyensúly, amely a közepes, jó és rekord embriótermeléshez szükséges az anyajuhokban, mennyire könnyen befolyásolható bizonyos metabolikus paraméterek által. Megállapítottuk, hogy a vérszérumban mért BHB, karbamid, NEFA, TP és koleszterol értékek élettani határértéken belüli

elhelyezkedése is nagyban közrejátszik a program kimenetelében. A fent említett paraméterek perifériás vérben mért szintje befolyásolja a donor anyajuhok szuperovulációs kezelést követő sárgatestszámát, kinyert és átültetésre alkalmas embrióinak számát és minőségét, **még akkor is, ha a mért értékek az élettani tartományon belül helyezkednek el.** Megállapítottuk továbbá, hogy a májkárosodásra utaló AST emelkedett szintje erős negatív hatással van a reprodukciós teljesítményre, hiszen a CL és az embriószám befolyásolása mellett a P4 perifériás vérben mért szintjének csökkentésén keresztül is hat.

A gyakorlatban tehát, akár üzemi, akár kísérleti körülmények között tervezzük az EÁ programot, érdemes a donorok előkészítése során vérvizsgálattal meggyőződni a fent említett metabolikus paraméterek szintjéről, hiszen az előre jelzi/jelezheti a donor programban való szereplését. Egy egyszerű vérvétel segítségével, a metabolikus paraméterek vérben mért szintjének megállapítása után eldönthetővé válik, melyik anyajuh alkalmas a programban donorként való szerepeltetésre, illetve javítani szükséges-e a donorként kiválasztott állatok állategészségügyi/energetikai státuszát. Ezzel elkerülhetővé válik, hogy olyan anyajuh kerüljön be az EÁ programba, amely állategészségügyi/energetikai státusza nem felel meg az elvárt közepes/jó/rekord embriótermelésnek.

3. A juh EÁ programokat befolyásoló, eddig kevésbé tanulmányozott terület a metabolikus hormonok vizsgálata. Donor anyajuhok esetében az IGF-1 és a tiroxin emelkedett szintje negatív hatással van az embriófejlődésre (kimosott és átültetésre alkalmas embriók száma és minősége). A recipiensek vemhesülését pedig a tiroxin (negatívan) és az inzulin (pozitív korreláció) perifériás vérben mért szintje is befolyásolta. Az eredmények gyakorlati hasznosíthatósága szempontjából jelen esetben leginkább az *inzulin* recipiensekre gyakorolt hatásának van jelentősége, hiszen a programban kiválogatott anyajuhok inzulin szintjét mérve már a program kezdetén meghatározható a vemhesülés kimenetele. Azok az anyajuhok, amelyek perifériás vérben mért inzulin szintje emelkedett az ivarzás idején, valószínűleg nagyobb arányban vemhesülnek majd az EÁ után.

Ugyanakkor fontos hangsúlyozni, hogy nagyobb állatlétszámmal elvégzett kísérletek szükségesek még ahhoz, hogy pontosan megadhassuk a metabolikus hormonokban és paraméterekben rejlő diagnosztika és prognosztika részleteit.

4. Kijelenthetjük továbbá, hogy a magyar merinó fajta AR eljárásokban való használatakor számítanunk kell több metabolikus hormon (IGF-1, inzulin, T3, T4, P4)

szezonális ingadozására is, amely eredményeink szerint elsősorban recipiensekben befolyásolta a vemhesülést. Recipiens anyajuhok esetében a szezonon belüli magasabb IGF-1 és inzulin, valamint alacsonyabb T3 szint hatott "kedvezően" az embrió megtapadására. Ezeket az adatokat figyelembe kell(ene) venni egy hazai tenyészetben tervezett program során, nem a hazánkban legelterjedtebb magyar merinó fajta a legalkalmasabb recipiens az EÁ programokban, amennyiben szezonon kívüli időszakban tervezzük azt.

Az egyes metabolikus hormonok és paraméterek juh EÁ programokban betöltött szerepe vált ismertté a disszertációban. Ezen faktorok diagnosztikai szereppel bírhatnak, és előre jelezhetik egy donor vagy recipiens anyajuh AR programra való alkalmasságát.

8. Összefoglalás

A modern, 21. századi állattenyésztés - még egy olyan, hagyományos tartási - tenyésztési rendszerrel rendelkező ágazatban, mint a juhtenyésztés - sem képzelhető el asszisztált reprodukciós módszerek és a biotechnológiai innovációk alkalmazása nélkül. Az ART közül a juhtenyésztésben a legáltalánosabban, üzemi körülmények között is alkalmazható a mesterséges termékenyítés friss, hűtött és fagyasztott spermával, az embrióátültetés és a hozzá kapcsolódó eljárások, mint például a szuperovuláció, embriókinyerés, az embrió in vitro tenyésztése, embriófagyasztás, in vitro embrió előállítás (in vitro fertilizáció, lombik bébi program). Hasonlóan más fajhoz, sajnos juhban is az embrió átültető program hatékonysága még mindig eléggé kiszámíthatatlan. Számos ismert és ma még ismeretlen tényező gyakorol hatást az embrióátültető program sikerére (hasznos embriók száma, embriók minősége, implantációs arány, az embrió transzfer sikere, stb.). Sajnos ismereteink az utóbbi évtizedekben nagyon elenyésző mértékben gyarapodtak a szuperovuláció mértékére/minőségére hatást gyakorló tényezőkkel kapcsolatban.

A kísérlet célja annak tanulmányozása volt, hogy a juh fajban eddig kevésbé tanulmányozott tényezőket, mint például a donor és recipiens állatok perifériás vérében a metabolikus hormonok szintjének (IGF-1, inzulin, T3 és T4), és az energiaellátottságról tájékoztató bizonyos metabolitok (BHB, NEFA, TP, karbamid, koleszterol, AST) szintjének milyen hatása van az embrióátültető program eredményességére. Ezen összefüggések feltárásával (vagy legalábbis az ezirányú kutatások elkezdésével) jobban megérthető az egyedek közti variabilitás egyik oka, és még biztonságosabban és kiszámíthatóbban alkalmazható módszerré válik az embriókinyerés- és átültetés juhban.

Vizsgálatainkat Mikepércsen, a Szücs-Juh Kft. telepén végeztük, 2009. és 2010. között, magyar merinó fajtájú anyajuhokkal.

A két éves vizsgálatsorozatunk alatt 2-2 (2 szezonon belüli és 2 szezonon kívüli), tehát összesen 4 EÁ programot indítottunk és összesen 71 állatot szerepeltettünk a kísérletsorozatban.

Az EÁ programok során azonos módon történt a donor, illetve a recipiens állatok előkészítése, a ciklust/ovulációt a biológiai tenyész-szezonban, valamint a tavaszi acikliás időszakban azonos módszerrel indukáltuk/szinkronizáltuk, és évszakonként

megegyezett a többszörös ovuláció (szuperovuláció) kiváltásának, valamint az ovarialis válaszkészség nyomon követésének a módja is. A donor állatokat laparoszóppal, mesterségesen termékenyítettük, ezt követően fedeztettük is, majd sebészi úton, median laparotomia alkalmazásával történt az embriókinyerés, majd a recipiensekbe való embrióátültetés is. A metabolikus paraméterek és hormonok meghatározásához szükséges vérminták gyűjtése a donor és a recipiens egyedektől mind 3 alkalommal, mind a 4 program esetében azonos protokoll szerint történt.

A 2009. és 2010. évi szezonon belüli, valamint a 2010. évi szezonon kívüli vizsgálatokat összehasonlítva egymással, nem találtunk szignifikáns különbséget a kinyert embriók, a beültetésre alkalmas embriók, és az átlagos donoronkénti CL szám esetében. Összességében tehát elmondható, hogy esetünkben nem befolyásolta az embrió transzfer program eredményességét, hogy szezonon belül, vagy azon kívüli időszakban történt-e a donorok szuperovulációs kezelése. A recipiensek esetében a két szezonon belüli program eredményei bárányozási arány és megszületett bárány/beültetett embrió tekintetében is hasonlóak, nincs közöttük szignifikáns eltérés. Azonban a szezonon kívüli, 2010. áprilisi program mindkét, fent említett paraméter esetében elmarad a szezonon belüli eredményektől (melynek oka lehet a recipiensek metabolikus hormonszint különbsége szezonon belül és azon kívül, vagy a merinó fajta szezonálisitása).

Alapvető különbségeket találtunk a két szezonon kívüli (áprilisi) program között, mind a donor, mind a recipiens anyajuhok esetében. A két vizsgált év (2009. és 2010.) szezonon kívüli embrió transzfer programjaiban részt vevő állatok vérmintáit összehasonlítva: egyértelműen látszik a BHB, karbamid, TP és koleszterol értékekből, hogy az állatok 2009-ben egy ún. relatív energia hiányban szenvedtek, ami ugyan klinikai tünetekben még nem nyilvánult meg, de elegendőnek bizonyult ahhoz, hogy alapvetően befolyásolja a 2009-es program eredményét. Ezt a helyzetet „súlyosbította” az a vélhetően már nem szubklinikai szintű májkárosodás, ami az emelkedett AST értékekből vált nyilvánvalóvá. Az eredményekből kiderült, hogy a metabolikus paraméterek akkor is befolyásolják azt a kényes hormonális és reprodukciós egyensúlyt, amely a közepes- jó vagy rekord embriótermeléshez szükséges, ha azok az élettani határértékeken belül helyezkednek el. Sikerült bizonyítani továbbá, hogy a korábban leírt metabolikus paraméterek milyen hatással bírnak juh embrióátültető program során a sárgatestszámra, kinyert és átültetésre alkalmas embriók számára.

A juh EÁ program eredményességét befolyásoló tényezők közül a metabolikus hormonok perifériás vérben mért szintjének is kiemelkedő jelentőség tulajdonítható. Recipiens anyajuhok vemhesülését befolyásolja a T4 és az inzulin perifériás vérben mért szintje. Donor anyajuhok esetében pedig a sárgatestek és a kinyert embriók számát az IGF-1 és a T4 szintje befolyásolja. A progeszteron szintje donor anyajuhokban mutatott szignifikáns összefüggést a sárgatestek és a kinyert embriók számával.

A szezonon belüli és azon kívüli időszak összehasonlításakor több metabolikus hormon esetében tapasztaltunk szezonális ingadozást. Saját vizsgálataink azt mutatják, hogy donor állatokban az IGF-1, recipiens állatokban az IGF-1 és az inzulin alap (D0 napi) szintje szignifikánsan különbözik februárban és áprilisban. Donor anyajuhokban az áprilisi IGF-1 alapszint, míg recipiensekben a februári IGF-1 és inzulin szintek bizonyultak magasabbnak. Donor anyajuhok esetében a T3 alap (D0 napi) és D3 napi értéke szignifikánsan, míg a T4 szintje tendenciaként áprilisban magasabb értékeket mutat, mint februárban. Recipiensek esetében a T3 D3 napi szintje szintén áprilisban mutat szignifikáns emelkedést februárhoz képest. A progeszteron esetében csak recipienseknél találtunk szignifikáns összefüggéseket. A P4 alap (D0 napi) szintje szignifikánsan magasabb szezonon kívül, míg D2 és D3 napi szintje szezonon belül magasabb. A szezonális ingadozás minden paraméter esetében összefüggésbe hozható a programok eredményeivel.

A 2009-es és 2010-es év 2-2 EÁ programjának eredményeit összevetve az általunk vizsgált metabolikus paraméterek és hormonok szintjeivel, megállapíthatjuk, hogy ezek alapvetően befolyásolják/befolyásolhatják egy juh embrióátültető program eredményességét. Az általunk leírt összefüggések figyelembe vételével még jobban megérthető és átlátható az a bonyolult paraméterrendszer, amely a donorok szuperovulációját és embriótermelését, valamint a recipiensek vemhesülését befolyásolja.

9. Summary

Modern animal breeding in the 21st century is inconceivable without assisted reproductive techniques and biotechnological innovations. Artificial insemination (using fresh, chilled or frozen sperm) and embryo transfer (in connection with procedures such as superovulation, embryo flushing, in vitro cultivation, embryo freezing, in vitro embryo production) are the methods that can be used in traditional sheep breeding. In sheep (similar to other species) effectiveness of superovulation and embryo transfer is very variable. Several known and yet unknown factors have impact on the efficiency of an ET program (number of good quality embryos, implantation rate, etc.). In the recent decades just a few scientific innovations came out in this area.

The aim of our research was to investigate less known factors affecting sheep reproduction, such as metabolic hormone (IGF-1, insulin, T3 and T4) and energy-status dependent metabolite (BHB, NEFA, TP, urea, cholesterol, AST) levels in the peripheral blood of donor and recipient ewes. Discovering these connections embryo flushing and transfer in sheep will be more safe and predictable, and the variability between individuals will be more understandable.

We carried out our research between 2009. and 2010. in Mikepércs, in the farm of Szücs- Juh Ltd., worked with ewes from the Hungarian Merino breed. In the 2 years of the research we achieved 2 programs in, and 2 programs out of the breeding season, working with 71 animals all together.

Preparation of the donor and recipient animals happened the same way during the ET programs, cycle/ovulation in biological breeding season/acyclic spring time has been induced/synchronised according to the same method, as generating superovulation and follow-up of ovarian response. Donor ewes have been inseminated artificially using laparoscope (after that natural mating), and operated by median laparotomy at embryo flushing. Transfer of the embryos into recipient animals has been achieved the same way (laparotomy). Blood samples were taken from Merino ewes in and out of season 3 times (D0: at the time of artificial insemination (AI)- donor ewes/heat- recipient ewes, D2: at the beginning of fasting before surgery, D3: at the time of embryo flushing/ET) during the AI and ET process for measuring the peripheral blood level of the hormones and metabolites.

There was no significant difference between the number of flushed and good quality embryos and the number of corpora lutea/donor in the programs of 2009. and 2010. (2009. out of season program has been excluded from the statistical analysis). All together we concluded, that season had no effect on the effectiveness of superovulation. In the case of recipients in season, there was no difference in lambing rate or lambs born/embryos transferred ratio. In 2010. out of season lambing rate and lambs born/embryos transferred ratio is failed compared to season programs (the reason why could be the different metabolic hormone level of the recipients or the seasonality of Merino breed).

We found major differences between 2009. and 2010. out of season (April) both in donor and recipient ewes. The blood samples showed significant differences in BHB, urea, TP and cholesterol, -which means, that the animals suffered from "relative energy defficiency" in 2009., which has not been manifested in clinical signs, but has been enough to influence the success of this program. The "situation" was heightened with a clinical form of hepatosis (elevated AST/GOT levels). These results showed, that even if these metabolic parameters are in the normal, phisiologycal range, their level can effect that sensitive hormonal and reproductive balance necessary for good/high embryo production. We also demonstrated, that these metabolites, mentioned above have a great impact on number of corpora lutea, flushed and transferable embryo number.

Next to metabolites, blood level of metabolic hormones were also important factors of the success of an ET program. Pregnancy rate was affected by the blood level of T4 and insulin in recipients. In donors, the number of corpora lutea and embryos flushed was in connection with IGF-1, T4 and insulin. Level of progesterone was in significant positive connection with the number of corpora lutea and embryos flushed in donor ewes.

There was seasonal variance comparing the level of metabolic hormones, we found seasonal variance. Our investigation showed, that basic level of IGF-1 and insulin was different in February (season) and April (out of season) in donor and recipient animals. In donors, D0 level of IGF-1 was significantly higher in April, while IGF-1 and insulin levels on D0 was significantly higher in February in recipients. Level of T3 (D0 and D3) significantly and T4 level as a tendency was higher in April (out of season) in donors. In recipients, T3 level was also higher in April (out of season).

In the case of progesterone, only recipient animals show significant results. There is a rise in the level of P4 out of season on D0 (on D2 and D3 levels were higher in February.). These seasonal changes correlate with the results of the transfer programs respectively.

In the comparison of the results of the ET programs (2 season and 2 out of season in 2009. and 2010.) and the levels of metabolic hormones and metabolites, we can conclude, that these factors were effecting the success of an ET program in sheep.

The results, described above help scientists and breeders to understand how this complex system of superovulation and embryo production could be influenced to make ET programs more successful and predictable.

10. Irodalomjegyzék

1. ABECIA, J.A., LOZANO, J.M., FORCADA, F., ZARAZAGA, L. (1997): Effect of level of dietary energy and protein on embryo survival and progesterone production on day eight of pregnancy in Rasa Aragonesa ewes. *Animal Reproduction Science*. 48. 209-218.
2. ADAMIAK, S.J., MACKIE, K., WATT, R.G., WEBB, R., SINCLAIR, K.D. (2005): Impact of nutrition on oocyte quality: cumulative effects of body composition and diet leading to hyperinsulinemia in cattle. *Biol. Reprod.* 73. 918- 926.
3. AL- QUDAH, K.M. (2011): Oxidant and antioxidant profile of hyperketonemic ewes affected by pregnancy toxemia. *Vet. Clin. Pathol.* 40. 60- 65.
4. ALSHAIKH, M.A., SALAH, M.S., KRAIDEES, M.S., ALSAIADY, M.Y., ABOUHEIF, M.A., ALDABEEB, S.N. (1997): Plasma concentration of thyroid hormones in lambs fed poultry offal meal in replacement of soybean meal at two different energy levels. *Deut. Tierarztl. Woch.* 104. 213–215.
5. AMIRIDIS, G. S., REKKAS, C. A., FTHENAKIS, G.C., VANINAS, E., LYMBEROPOULOS, A., CHRISTODOULOU, V., BELIBASAKI, S. (2002): Progesterone concentration as an indicator of ovarian response to superovulation in Chios ewes. *Theriogenology*. 57. 1143- 1150.
6. AMARIDIS, G.S., CSEH S. (2012): Assisted reproductive technologies in the reproductive management of small ruminants. *Animal Reproduction Science*. 130. 152- 161.
7. ANDRABI, S.M.H., MAXWELL, W.M.C. (2007): A review on reproductive biotechnologies for conservation of endangered mammalian species. *Animal Reproduction Science*. 99. 223-243.

8. ANEL, L., KAABI, M., ABROUG, B., ALVAREZ, M., ANEL, E., BOIXO, J.C., DE LA FUENTE, L.F., DE PAZ, P. (2005): Factors influencing the success of vaginal and laparoscopic artificial insemination in churra ewes: a field assay. *Theriogenology*. 63. 4. 1235-1247.
9. ARMSTRONG, D.T., EVANS, G. (1983): Factors influencing success of embryo transfer in goats. *Theriogenology*. 19. 31-42.
10. ARMSTRONG, D.G., GONG, J.G., GARDNER, J.O., BAXTER, G., HOGG, C.O., WEBB, R. (2002): Steroidogenesis in bovine granulosa cells: the effect of short- term changes in dietary intake. *Reproduction*. 123. 371- 378.
11. ARMSTRONG, D.G., GONG, J.G., WEBB, R. (2003): Interactions between nutrition and ovarian activity in cattle: physiological, cellular and molecular mechanisms. *Reproduction*. 61. (Suppl.) 403- 414.
12. ASWORTH, C.J., SALES, D.I., WILMUT, I. (1989): Evidence of an association between the survival of embryos and the periovulatory plasma progesterone concentration in the ewe. *J. Reprod. Fertil.* 87. 23-32.
13. BAKER, J., HARDY, M.P., ZHOU, J., BONDY, C., LUPU, F., BELLVE, A.R., EFSTRATIADIS, A. (1996): Effects of an IGF-1 gene null mutation on mouse reproduction. *Mol. Endocrinol.* 10. 903- 918.
14. BARI, F., KHALID, M., HARESIGN, W., MURRAY, A., MERRELL, B. (2002): Factors affecting the survival of sheep embryos after transfer within a MOET program. *Theriogenology*. 59. 1265- 1275.
15. BARIL, G., TRALDI, A.L., COGNIÉ, Y., LEBEUF, B., BECKERS, J.F., MERMILLOD, P. (2001): Successful direct transfer of vitrified sheep embryos. *Theriogenology*. 56. 2. 299-305.

16. BARRY, D.M., VAN NIEKERK, C.H., RUST, J., VAN DER WALT, T. (1990): Cervical embryo collection in sheep after ripening of the cervix with prostaglandin E2 and estradiol. *Theriogenology*. 33. 1. 190.
17. BECZE J. (1987): A juh szezonális ivarzása. Összefoglaló ismertetés. *Magyar Állatorvosok Lapja*. 42. 8. 475-478.
18. BECZE J., LÁTITS GY., MÁTRAI T. (1971): Ivarzás kiváltása juhokon, tenyészedényen kívül, egyszeri injekciós beavatkozással. *Magyar Állatorvosok Lapja*. 26. 4. 211.
19. BERGMAYER, H.U., BOWES, G.N., JR HORDER, M., MOSS, D.W. (1976): Provisional recommendation on IFCC methods for the measurements of catalytic concentrations of enzymes, Part 2 IFCC methods for aspartate aminotransferase. *Clin. Chem. Acta*. 70. F 19-F-42.
20. BESENFELDER, U., HÁZAS G., GYÖKÉR E., GERGÁTZ E., BREM, G. (1994): Laparoscopic embryo transfer into the fallopian tube in sheep. *Theriogenology*. 41. 1. 162.
21. BLOCK, J., DROST, M., MONSON, R.L., RUTLEDGE, J.J. RIVERA, R.M., PAULA- LOPES, F.F. (2003): Use of insulin- like growth factor-1 during embryo culture and treatment of recipients with gonadotropin- releasing hormone to increase pregnancy rates following the transfer of in- vitro produced embryos to heat- stressed, lactating cows. *J. Anim. Sci*. 81. 1590- 1602.
22. BLOCK, J., HANSEN, P.J. (2007): Interaction between season and culture with insulin- like growth factor- 1 on survival of in vitro produced embryos following transfer to lactating dairy cows. *Theriogenology*. 67. 1518- 1529.
23. BLOCK, J. (2007): Use of insulin- like growth factor-1 to improve post- transfer survival of bovine embryos produced in vitro. *Theriogenology*. 68. 49- 55.

24. BODIN, I., DRION, P.V., REMY, B., BRICE, G., COGNIÉ, Y., BECKERS, J.F. (1997): Anti- PMSG antibody levels in sheep subjected annually to oestrus synchronisation. *Reprod. Nutr. Dev.* 37. 651- 660.
25. BODÓ I., SZALAY I. (2007): Génbázisok megőrzése a fenntartható állattenyésztésben. *Állattenyésztés és takarmányozás.* 56. 5. 403- 413.
26. BOLAND, M.P., LONERGAN, P., O' CALLAGHAN, D. (2000): Effect of nutrition on endocrine parameters, ovarian physiology, and oocyte and embryo development. *Theriogenology.* 65. 1323- 1340.
27. BOLS, P.E.J., LANGBEEN, A., VERBERCKMOES, S., LEROY, J.L.M.R. (2010): Artificial insemination in livestock production: the Vet's perspective. *Facts, Views and Vision in ObGyn. Monographs.* 6–12.
28. BREM, G., BRENIG, B., MULLER, M., SPRINGMANN, K. (1989): Ex situ cryoconservation of genomes and genes of endangered cattle breeds by means of modern biotechnological methods. *FAO Animal Production and Health Paper.* 76. Rome.
29. BUCKRELL, B.C., BUSCHBECK, C., GARTLEY, C.J., KROETSCH, T., MCCUTCHEON, W., MARTIN, J., PENNER, W.K., WALTON J.S. (1994): Further development of a transcervical technique for artificial insemination in sheep using previously frozen semen. *Theriogenology.* 42. 601- 611.
30. BUTLER, W.R., CALAMAN, J. J., BEAM, S. W. (1996): Plasma and milk urea nitrogen in relation to pregnancy rate in lactating dairy cattle. *J. Anim. Sci.* 74. 858- 865.
31. BYRNE, A.T., SOUTHGATE, J., BRISON, D.R., LEESE, H.J. (2002): Regulation of apoptosis in the bovine blastocyst by insulin and the insulin- like growth factor (IGF) superfamily. *Mol Reprod Dev.* 62. 489- 495.

32. CAMPBELL, B.K., SCARAMUZZI, R.J., WEBB, R. (1996): Induction and maintenance of oestradiol and immunoreactive inhibin production with FSH by ovine granulosa cells cultured in serum- free media. *J. Reprod. Fertil.* 106. 7- 16.
33. CANDAPPA, I.B.R., BARTLEWSKI, P.M. (2011): Open Access A Review of Advances in Artificial Insemination (AI) and Embryo Transfer (ET) in Sheep, with the Special Reference to Hormonal Induction of Cervical Dilation and its Implications for Controlled Animal Reproduction and Surgical Techniques. *The Open Reproductive Science Journal.* 3. 162-175.
34. CHEMINEAU, P., PROCUREUR, R., COGNINE, Y., LEFEVRE, P.C., LOCATELLI, A., CHUPIN, D. (1986): Production, freezing and transfer of embryos from a blue tongue infected goat herd without blue tongue transmission. *Theriogenology.* 26. 279- 290.
35. CHEMINEAU, P., GUILLAUME, D., MIGAUD, M., THIÉRY, J.C., PELLETTIER-RUBIO, M.T., MALPAUX, B. (2008): Seasonality of reproduction in mammals: intimate regulatory mechanisms and practical implications. *Reprod. Dom. Anim.* 43(Suppl. 2). 40-47.
36. CHILLARD, Y., BOCQUIER, F., DOREAU, M. (1998): Digestive and metabolic adaptations of ruminants to undernutrition, and consequences on reproduction. *Reprod Nutr Dev.* 38. 131–152.
37. CLEMMONS, D.R. (1997): Insulin- like growth faktor binding proteins and their role in controlling IGF action. *Cytokine Growth Factor Rev.* 8. 45- 62.
38. COCERO, M. J., LOPEZ SEBASTIAN, A., BARRAGAN, M.L., PICAZO, R.A. (1996): Differences on Post-thawing Survival between Ovine Morulae and Blastocysts Cryopreserved with Ethylene Glycol or Glycerol. *Cryobiology.* 33. 5. 502-507.

39. COGNIÉ, Y. (1999): State of the art in sheep- goat embryo transfer. *Theriogenology*. 51. 105-116.
40. COGNIÉ, Y., BARIL, G., POULIN, N., MERMILLOD, P. (2003): Current status of embryo technologies in sheep and goat. *Theriogenology*. 59. 171-188.
41. COONROD, S.A., FLORES- FOXWORTH, G., MORENO, J.F., WESTHUSIN, M., BYRD, S.R., KRAEMER, D.C. (1994): Birth of Armenian red sheep (*Ovis orientalis*) lambs to domestic sheep following interspecific transfer of IVM-IVF derived embryos. *Theriogenology*. 41. 182. (abstract)
42. CUETO, M.I., GIBBONS, A.E., PEREYRA-BONNET, F., SILVESTRE, P., GONZÁLEZ-BULNES, A. (2011): Effects of season and superovulatory treatment on embryo yields in fine-wool Merinos maintained under field conditions. *Reprod. Domest. Anim.* 46. 5. 770-775.
43. CUNNINGHAM, E.P. (1996): Genetic diversity in domestic animals: strategies for conservation and development. In: Miller, R.H. et al. (Eds), *Proc. XX. Beltsville Symposium: Biotechnology 's role in genetic improvement in farm animals*, USDA, 13-23.
44. CSEH S., BILTON, R.J., BÉNYEI B. (1986): A juhembrió- átültetés eddigi eredményei az üllői embriológiai állomáson. *Magyar Állatorvosok Lapja*. 41. 6. 329- 331.
45. CSEH S., LIGETVÁRI T., TÖRÖK M. (1990): Géntartalék- juhajták szaporítása a legújabb biotechnikai eljárásokkal. *Magyar Állatorvosok Lapja*. 45. 7. 424-426.
46. CSEH S., SZÁSZ F., BÉNYEI B., TÖRÖK M., LIGETVÁRI T. (1991): Juhembriók kinyerésének és átültetésének laparoszóppal végzett új technikája. *Magyar Állatorvosok Lapja*. 46. 2. 91-92.

47. CSEH S., SEREGI J. (1993): Practical experiences with sheep embryo transfer. *Theriogenology*. 39. 1. 207.
48. CSEH S., BÉNYEI B., SEREGI J., TREUER Á., TÖRÖK M. (1994): A juhembrió- átültetés gyakorlati tapasztalatai. *Magyar Állatorvosok Lapja*. 49. 5. 290- 294.
49. CSEH S., TREUER Á., BESENFELDER U., BREM G., BÉNYEI B., SEREGI J. (1995): In vitro fertilizációval előállított juhembriók sikeres átültetése. *Magyar Állatorvosok Lapja*. 50. 11. 829-831.
50. CSEH S., SOLTI L. (2001): Studies on factors affecting superovulation and embryo transfer in hungarian merino ewes. *Acta Veterinaria Hungarica*. 49. 4. 431- 441.
51. CSEH S., DOHY J. (2003): Asszisztált reprodukciós technikák (ART) a hazai állattenyésztési gyakorlatban: történeti áttekintés. *Állattenyésztés és Takarmányozás*. 52. 1. 3-15.
52. CSEH S., FAIGL V., AMIRIDIS, G.S. (2012): Semen processing and artificial insemination in health management of small ruminants. *Anim. Reprod. Sci.* 130. 187-192.
53. D' ALESSANDRO, A.G., MARTEMUCCI, G., TAIBI, I. (2005): How the FSH/LH ratio and dose numbers in the P-FSH administration treatment regimen and insemination schedule affect superovulatory response in ewes. *Theriogenology*. 63. 1764- 1774.
54. DINNYÉS A., MENG, Q., POLGAR ZS., BOONKOSUL, D., SOMFAI T. (2006): Cryopreservation of mammalian embryos. *Acta Scientiae Veterinariae*. 34. 171-190.
55. DOBRINSKY, J.R. (2002): Advancements in cryopreservation of domestic animal embryos. *Theriogenology*. 57. 1. 285-302.

56. DOHY J. (2000): Biotechnológia és állatnemesítés- új eredmények, kihívások, kilátások. *Állattenyésztés és takarmányozás*. 49. 3. 285-288.
57. DONOVAN, A., HANRAHAN, J.P., LALLY T., BOLAND, M.P., LONERGAN, G.P., O'NEIL, D.J. (2001): AI for sheep using frozen-thawed semen, ARMIS 4047 Project report, under the Research Stimulus Fund; OPARDF measure 5b, ISBN 1 84170 152 1
58. DONOVAN, A., HANRAHAN, J.P., KUMMEN, E., DUFFY, P., BOLAND, M.P. (2004): Fertility of the ewe following cervical insemination with fresh or frozen-thawed semen at natural or synchronised oestrus, *Animal Reproduction Science*. 84. 359-368.
59. DOWNING, J.A., SCARAMUZZI, R.J. (1997): The effect of the infusion of insulin during the luteal phase of the estrous cycle on the ovulation rate and on plasma concentrations of LH, FSH and glucose in ewes. *Theriogenology*. 47. 747-759.
60. DRACKLEY, J.K. , OVERTON, T.R., DOUGLAS, G.N. (2001): Adaptations of glucose and long-chain fatty acid metabolism in liver of dairy cows during the periparturient period. *J Dairy Sci. Suppl* 84:E100
61. DUKELOW, W.R., ARIGA, S. (1976): Laparoscopic techniques for biomedical research. *J. Med. Primatol*. 5. 82-99.
62. DUNNE, L.D., DISKIN, M. G., BOLAND, M.P., O' FARRELL, K.J., SREENAN, J.M. (1999): The effect of pre- and post- insemination plane of nutrition on embryo survival in beef heifers. *Anim. Sci*. 69. 411- 417.
63. DYRMUNDSSON, O.R. (2007): The development of artificial insemination in sheep and goats in Iceland. 58th Annual Meeting of the European Association for Animal Production, Dublin, Ireland, 26-29 August, 2007.

64. ELROD, C.C., BUTLER, W.R. (1993): Reduction of fertility and alteration of uterine pH in heifers fed excess ruminally degradable protein. *J. Anim. Sci.* 71. 694- 701.
65. EVANS, G., MAXWELL, W.M.C. (1987): *Salamon's Artificial Insemination of Sheep and Goats*. Butterworths, Sydney, Australia. 1987.
66. EVANS, A.C., FLYNN, J.D., DUFFY, P., KNIGHT, P.G., BOLAND, M.P. (2002): Effects of ovarian follicle ablation on FSH, oestradiol and inhibin A concentrations and growth of other follicles in sheep. *Reproduction*. 123. 59–66.
67. FAHEY, J., BOLAND, M. P., O'CALLAGHAN, D. (1998): Effects of dietary urea on embryo development in superovulated donor ewes and on embryo survival following transfer in recipient ewes. *Proceedings of the Annual Meeting of British Society of Animal Science*. Abstract 182.
68. FAIGL V., VASS N., JÁVOR A., KULCSÁR M., SOLT L., AMIRIDIS, G.S., CSEH S. (2012): Artificial insemination of small ruminants – a review. *Acta Vet Hung.* 60. 115-129.
69. FERNANDEZ-ABELLA, D., PREVE, M.O., VILLEGAS, N. (2003): Insemination time and diluting rate of cooled and chilled ram semen affects fertility. *Theriogenology*. 60. 21-26.
70. FERNANDEZ- ARIAS, A., ALABART, J.L., FOLCH, J. BECKERS, J.F. (1999): Interspecies pregnancy of Spanish ibex (*Capra pyrenaica*) fetus in domestic goat (*Capra hircus*) recipients induces abnormally high plasmatic levels of pregnancy- associated glycoprotein. *Theriogenology*. 51. 1419- 1430.
71. FLINK F. (2010): A haszonállat embrióátültetés jelen helyzete Európában és hazánkban.

72. FLORES- FOXWORTH, G., MCBRIDE, B.M., KRAEMER, D.C., NUTI, L.C. (1992): A comparison between laparoscopic and transcervical embryo collection and transfer in goats. *Theriogenology*. 37. 1. 213.
73. FRANCISCO, C.C., SPICER, L.J., PAYTON, M.E. (2003): Predicting cholesterol, progesterone, and days to ovulation using postpartum metabolic and endocrine measures. *J. Dairy Sci.* 86. 2852- 63.
74. GAÁL T. (szerk). (1999): Állatorvosi klinikai laboratóriumi diagnosztika. Sik Kiadó Kft. 490 p. ISBN: 9789638582195
75. GALLI, C., DUCHI, R., CROTTI, G., PONDERATO, P., TURINI, N., COLLEONI, S., LAGUTINA, I., LAZZARI, G. (2003): Bovine embryo technologies. *Theriogenology*. 59. 599–616.
76. GERGÁTZ E., GYÖKÉR E. (1997): Cervicouterinal Insemination method with cooled and deep frozen ram semen. 48. Annual Meeting of EAAP. Vienna. Book of Abstract. 319-325.
77. GIBBONS, A., CUETO, M.I., BONNET, P. (2011): A simple vitrification technique for sheep and goat embryo cryopreservation. *Small Ruminant Research*. 95. 61-64.
78. GILLAN, L., MAXWELL, M.C. (1998): The functional integrity and fate of cryopreserved ram spermatozoa in the female tract. Vth International Symposium on Reproduction in Domestic Ruminants. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 54. 271–283.
79. GILLAN, L., MAXWELL, M.C., EVANS, G. (2004): Preservation and evaluation of semen for artificial insemination. *Reprod. Fertil. Dev.* 16. 447–454.
80. GEROSA, SKOET (2012): "Milk availability- Trends in production and demand and medium- term outlook". FAO, United Nations

81. GONG, J.G., MCBRIDE, D., BRAMLEY, T.A., WEBB, R. (1993) a: Effects of recombinant bovine somatotropin, insulin- like growth factor-I and insulin on the proliferation of bovine granulosa cell in vitro. *J Endocrinol.* 139. 67-75.
82. GONG, J.G., BRAMLEY, T.A., WEBB, R. (1993) b: The effect of recombinant bovine somatotrophin on ovarian follicular growth and development in heifers. *J Reprod Fertil.* 97. 247-54.
83. GONG, J.G., MCBRIDE, D., BRAMLEY, T.A., WEBB R. (1994): Effects of recombinant bovine somatotrophin, insulin- like growth factor-I and insulin on bovine granulosa cell steroidogenesis in vitro. *J Endocrinol.* 143. 157-64.
84. GONG, J.G., BAXTER, G., BRAMLEY, T.A., WEBB, R. (1997): Enhancement of ovarian follicle development in heifers by treatment with recombinant bovine somatotrophin: a dose response study. *J Reprod Fertil.* 110. 91-7.
85. GONG, J.G., ARMSTRONG, D.G., BAXTER, G., HOGG, C.O., GARNSWORTHY, P.C., WEBB, R. (2002): The effect of increased dietary intake on superovulatory response to FSH in heifers. *Theriogenology.* 57. 1591-1602.
86. GOU, K.M., GUAN, H., BAI, J.H., CUI, Y.H., WU, Z.F., YAN, F.X., AN, X. R. (2008): Field evaluation of juvenile in vitro embryo transfer (JIVET) in sheep. *Animal Reproduction Science.* 112. 3-4. 316-324.
87. GONZALEZ-BULNES, A., BAIRD, D. T., CAMPBELL, K., COCERO, M.J., GARCIA-GARCIA, R.M., INSKEEP, E. K., LOPEZ-SEBASTIAN, A., MCNEILLY, A.S., SANTIAGO- MORENO, J., SOUZA, C.J.H., VEIGA-LOPEZ, A. (2004): Multiple factors affecting multiple ovulation and embryo transfer in sheep and goats. *Reprod. Fertil. Develop.* 16. 421–435.
88. GYULAI GY., PETHES J. (1986): Tenyésztés és biotechnika. *Magyar Mezőgazd.* 41.49.13.

89. HARASZTI J., RÓNAY G. (1977): Petesejt-transzplantációs vizsgálatok nyulakban és juhokban. Előzetes Közlemény. Magyar Állatorvosok Lapja. 32. 429.
90. HARESIGN, W. (1992): Manipulation of reproduction in sheep. *Journal of Reproduction and Fertility*. 45. 127-139.
91. HARRISON, L.M., RANDEL, R.D. (1986): Influence of insulin and energy intake on ovulation rate, luteinizing hormone and progesterone in beef heifers. *J Anim Sci*. 63. 1229-1235.
92. HARRISON, R.M., WILDT, D.E. (eds): *Animal laparoscopy*. Williams and Wilkins, Baltimore, 1980.
93. HERDT, T.H. (2000): Ruminant adaptation to negative energy balance. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*. 16. 215–230.
94. HERRLER, A., EINSPANIER, R., SCHAMS, D., NIEMANN, H. (1994): Effect of recombinant bovine somatotropin (rBST) on follicular IGF-1 contents and the ovarian response following superovulatory treatment in dairy cows: a preliminary study. *Theriogenology*. 41. 601- 611.
95. HILD-PETITO, S., OTTOBRE, A.C., HYER, P.B. (1987): Comparison of subpopulations of luteal cells obtained from cyclic and superovulated ewes. *J. Reprod. Fert*. 80. 537-544.
96. HILL, J.R., THOMSON, J.A., PERKINS, N.R. (1998): Factors affecting pregnancy rates following laparoscopic insemination of 28, 447 Merino ewes under commercial conditions: a survey. *Theriogenology*. 49. 697-709.
97. HIWASA, M., KOHNO, H., TOGARI, T., OKABE, K., FUKUI, Y. (2009): Fertility after different artificial insemination methods using a synthetic semen extender in sheep. *J. Reprod. Dev*. 55. 50-54.

98. HODGES, J. (ed) (1992): The management of global animal genetic resources. FAO Anim. Prod. Health Paper, 104. FAO, Rome, 1992.
99. HOLDAS S., KOPPÁNY Á., MOLNÁR A., KRASZNAI A., KUKOVICS S. (1994): Identikus ikerbárányok előállítása embriófelezéssel. Magyar Állatorvosok Lapja. 49. 5. 284-289.
100. HOLT, W.V., PICKARD, A.R. (1999): Role of reproductive technologies in genetic resource banks in animal conservation. Rev. Reprod. 4. 143-150.
101. HOSSEINI-PAJOH, K., TAJIK, P., GHARAGOOZLOO, F. (2005): Intrauterine laparoscopic artificial insemination and cervical insemination in superovulated ewes for embryo transfer. Journal of the Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran. Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran. 55. 4. 61-66.
102. HUNTER, G. L., ADAMS, C. E., ROWSON, L. E. (1955): Inter- bred ovum transfer in sheep. J. Agric. Sci. 46. 143-149.
103. HUNTER, M.G., ROBINSON, R.S., MANN, G.E., WEBB, R. (2004): Endocrine and paracrine control of follicular development and ovulation rate in farm species. Anim. Reprod. Sci. 82-83. 461-477.
104. ISACHENKO, V., ALABART, J.L., DATTENA, M., NAWROTH, F., CAPPAL, P., ISACHENKO, E., COCERO, M.J., OLIVERA, J., ROCHE, A., ACCARDO, C., KRIVOKHARCHENKO, A., FOLCH, J. (2003): New technology for vitrification and field (microscope-free) warming and transfer of small ruminant embryos. Theriogenology. 59. 5-6. 1209-1218.
105. ISHWAR, A.K., MEMON, M.A. (1996): Embryo transfer in sheep and goats: a review. Small Ruminant Research. 19. 35-43.

106. JABBOUR, H.N., RYAN, J.P., EVANS, G., MAXWELL, W.M. (1991): Effects of season, GnRH administration and lupin supplementation on the ovarian and endocrine responses of merino ewes treated with PMSG and FSH-P to induce superovulation. *Reprod. Fertil. Dev.* 3. 699-707.
107. JABLONKA-SHARIFF, A., GRAZUL-BILSKA, A.T., REDMER, D.A., REYNOLDS, L. P. (1993): Growth and cellular proliferation of ovine corpora lutea throughout the estrous cycle. *Endocrinology* 133. 1871-1879.
108. JÁVOR A., KOMLÓSI I., KUKOVICS S., LENGYEL A. (2003): Elmulasztott lehetőségek a magyar juhtenyésztés fejlesztésében. Az állattenyésztés szolgálatában. DE-ATC Tudományos Tanácsülés, Debrecen, 11-25.
109. JOSEPHSON, B., GYLLENSWARD, C. (1957): The development of the protein fractions and of cholesterol concentration in the serum of normal infants and children. *Scand. J. clin. Lab. Invest.* 9. 21-38.
110. JOUSAN, F.D., HANSEN, P.J. (2007): Insulin-like growth factor-1 promotes resistance of bovine preimplantation embryos to heat shock through action independent of its anti-apoptotic actions requiring PI3K signaling. *Mol. Reprod. Dev.* 74. 189-196.
111. KAABI, M.- ALVAREZ, M., ANEL, E., CHAMORRO, C.A., BOIXO, J.C., DE PAZ, P., ANEL, L. (2006): Influence of breed and age on morphometry and depth of inseminating catheter penetration in the ewe cervix: a postmortem study. *Theriogenology*. 66. 8. 1876- 1883.
112. KAKAR, M.A., MADDOCKS, S., LORIMER, M.F., KLEEMANN, D.O., RUDIGER, S.R., HARTWICH, K.M., WALKER, S.K. (2005): The effect of peri-conception nutrition on embryo quality in the superovulated ewe. *Theriogenology*. 64. 1090- 1103.
113. KARAGIANNIDIS, A., VARSAKELI, S., KARATZAS, G., BROZOS, C. (2001): Effect of time of artificial insemination on fertility of progestagen and

PMSG treated indigenous Greek ewes, during non-breeding season. *Small Ruminant Research*. 39. 67-71.

114. KARDYMOWICZ, M., STEPINSKI, J. (1957): Transfer of ova in the sheep. *Rocz. Nauk. Roln. Ser. B. Zootech.* 71. 389–42. (*Anim. Breed. Abstr.* 26, Abstr. 860).
115. KAULFUSS, K. H., GIUCCI, E., SÜSS, R., WÓJTOWSKI, J. (2006): An ultrasonographic method to study reproductive seasonality in ewes isolated from rams. *Reprod. Domest. Anim.* 41. 5. 416- 422.
116. KELLY, J.M., KLEEMANN, D.O., WALKER, S.K. (2005) a: Enhanced efficiency in the production of offspring from 4-to 8- week- old lambs. *Theriogenology*. 63. 1876-1890.
117. KELLY, J.M., KLEEMANN, D.O., WALKER, S.K. (2005) b: The effect of nutrition during pregnancy on the in vitro production of embryos from resulting lambs. *Theriogenology*. 63. 2020- 2031.
118. KERSHAW, C.M., KHALID, M., MCGOWAN, M.R., INGRAM, K., LEETHONGDEE, S., WAX G., SCARAMUZZI, R.J. (2005): The anatomy of the sheep cervix and its influence ont the transcervical passage of an inseminating pipette into the uterine lumen. *Theriogenology*. 64. 5. 1225-1235.
119. KHALID, M., HARESIGN, W. (1996): Relationships between concentrations of ovarian steroids, insulin- like growth factor-1 and IGF- binding proteins during follicular development in the ewe. *Anim. Reprod. Sci.* 41. 119- 129.
120. KHALID, M., HARESIGN, W., LUCK, M.R. (2000): Secretion of IGF-1 by ovine granulosa cells: effects of growth hormone and follicle stimulating hormone. *Animal Reproduction Science*. 58. 261- 272.

121. KHAMSI, F., ROBERGE, S., WONG, J. (2001): Novel demonstration of a physiologic/ pharmacologic role of insulin- like growth factor-1 in ovulation in rats and action on cumulus oophorus. *Endocrine*. 14. 175- 180.
122. KILLEEN, I. D., CAFFERY, G., HOLT, N. (1982): Fertility of ewes following intra- uterine insemination with the aid of a laparoscope. *Proceedings 14th Annual Conference Australian Society for Reproductive Biology*. 104.
123. KLAMBAUER, P., KERESZTES ZS., KANYÓ K., VARGA E., KRISTON R., VASS N., JÁVOR A., KONC J., SOLT L., CSEH S. (2009): Vitrification of cleavage stage mouse embryos by Cryoloop procedure. *Acta Veterinaria Hungarica*. 3. 57. 399- 410.
124. KLEEMANN, D.O., WALKER, S.K., SEAMARK, R.F. (1994): Enhanced fetal growth in sheep administered progesterone during the first three days of pregnancy. *J. Reprod. Fertil.* 102. 411-417.
125. KONG, W.M., MARTIN, N.M., SMITH, K.L., GARDINER, J.V., CONNOLEY, I.P., STEPHENS, D.A., DHILLO, W.S., GHATEI, M.A., SMALL, C.J., BLOOM, S.R. (2004): Triiodothyronine stimulates food intake via the hypothalamic ventromedial nucleus independent of changes in energy expenditure. *Endocrinology*. 45. 5252–5258.
126. KUKOVICS S. (2006): Jelentősebb magyarországi juhajták és genotípusok. In: Jávor, A., Kukovics, S., Molnár, Gy. (szerk.) *Juhtenyésztés A-tól Z- ig*. Mezőgazda Kiadó. ISBN: 963- 286- 275- 9.
127. KUKOVICS S., GYÖKÉR E., NÉMETH T., GERGÁTZ E. (2011): Artificial Insemination of Sheep- Possibilities, Realities and Techniques at the Farm Level. In: Milad Manafi (szerk.) *Artificial Insemination in Farm Animals*. InTech. ISBN 978-953-307-312-5. 27-50

128. KULCSÁR M., DANKÓ G., DELAVALD, C., MIRCU, C., NIKOLIC, A.J., GÁSPÁRDY A., CERNESCU, H., CHILLIARD, Y., CSEH S., RUDAS P., HUSZENICZA G. (2006): Endocrine characteristics of late pregnant hyperketonaemic ewes and their reproductive performance following the induction of ovarian cyclicity out of the breeding season. *Acta Vet. Hung.* 54. 235- 249.
129. LÁTITS GY. (1987): Néhány ciklusindukciós hormonpreparátum összehasonlító vizsgálata juhban. *Magyar Állatorvosok Lapja.* 42.8. 479-481.
130. LEROY, J.L.M.R., VAN SOOM, A., OPSOMER, G., BOLS, P.E.J. (2008): The consequences of metabolic changes in high- yielding dairy cows on oocyte and embryo quality. *Animal.* 2. 8. 1120- 1127.
131. LI, Q.Y., GUAN, H., HOU, J., AN, X.R., CHEN, Y.F. (2008): Technical note: Transfer of ovine embryos through a simplified mini- laparotomy technique. *Journal of Animal Science.* 86. 3224- 3227.
132. LOPYRIN, A.I., LOGINOVA, N.V., KARPOV, P.L. (1950): Changes in the exterior of lambs as a result of interbreed embryonic transfer (in Russian). *Dokl. Akad. Nouk. SSSR Ser. Biol.* 74. 1019–1021. (*Anim. Breed. Abstr.* 19, Abstr. 1262).
133. LOPYRIN, A.I., LOGINOVA, N.V., KARPOV, P.L. (1951): The effect of changed conditions during embryogenesis on the growth and development of lambs (in Russian). *Sov. Zootteh.* 6. 83–95. (*Anim. Breed. Abstr.* 20, Abstr. 729).
134. LOZANO, J.M., BOLAND, M.P., O' CALLAGHAN, D. (2000): Effect of nutrition on embryo development in ewes. *Proc. Internat. Congr. Anim. Reprod.* Stockholm.

135. LOZANO, J.M., LONERGAN, P., BOLAND, M.P., O'CALLAGHAN, D. (2003): Influence of nutrition on the effectiveness of superovulation programmes in ewes: effect on oocyte quality and post- fertilization development. *Reproduction*. 125. 543- 553.
136. LUCIDI, P., BARBONI, B., MATTIOLI, M. (2001): Ram- induced ovulation to improve artificial insemination efficiency with frozen semen in sheep. *Theriogenology*. 55. 1797- 1805.
137. MAGYAR K., KOMLÓSI I., VERESS L. (1989): Laparoscopic intrauterine insemination of sheep with deep-frozen semen. Preliminary report. *Magyar Állatorvosok Lapja*. 44. 8. 475-477.
138. MAGYAR K. (1994): New insemination pipette for the intrauterine laparoscopic insemination of sheep. *Magyar Állatorvosok Lapja*. 49. 8. 478-479.
139. MAILLO, V., RIZOS, D., BESENFELDER, U., HAVLICEK, V., KELLY, A.K., GARRETT, M., LONERGAN, P. (2012): Influence of lactation on metabolic characteristics and embryo development in postpartum Holstein dairy cows. *J Dairy Sci*. 95. 3865- 3876.
140. MAKAREVICH, A.V., MARKKULA, M. (2002): Apoptosis and cell proliferation potential of bovine embryos stimulated with insulin- like growth factor-1 during in vitro maturation and culture. *Biol. Reprod*. 66. 386- 392.
141. MARONGIU, M.L., GULINATI, A., CANNAS, A. (2009): Effect of dietary protein concentration on blood urea level and reproduction efficiency of the lactating rabbit doe. *World Rabbit Science*. Vol. 17 (4). ISSN 1257-5011. Article.

142. MAZUR, P., LEIBO, S.P., SEIDEL, G.E. (2008): Cryopreservation of the germplasm of animals used in biological and medical research: importance, impact, status and future directions. *Biology of reproduction*. 78. 2- 12.
143. MAXWELL, M.C., WATSON, P.F. (1996): Recent progress in the preservation of ram semen. *Anim. Reprod. Sci.* 42. 55–65.
144. MCCUSKER, R.H., COHICK, W.S., BUSBY, W.H., CLEMMONS, D.R. (1991): Evaluation of the developmental and nutritional changes in porcine IGFBP-1 and IGFBP-2 serum levels by immunoassay. *Endocrinology*. 129. 2631-2638.
145. MCGINNIS, L.K., DUPLANTIS, S.C., YOUNGS, C.R. (1993): Cryopreservation of sheep embryos using ethylene glycol. *Animal Reproduction Science*. 30. 273- 280.
146. MCEVOY, T.G., ROBINSON, J.J., AIKEN, R.P., FINDLAY, P.A., ROBERTSON, I.A. (1995): Relationship between pre- ovulatory feed intake, progesterone priming and the subsequent in vitro development of ova collected from superovulated ewes. *Theriogenology*. 43. 276. (abstract)
147. MCKELVEY, W.A.C., ROBINSON, J.J., AITKEN, R.P. (1988): The use of reciprocal embryo transfer to separate the effects of pre- and post- mating nutrition on embryo survival and growth of the ovine conceptus. *Proc. 11th Int. Cong. Anim. Repr. And A.I. Dublin*, p. 176. (abstract)
148. MCKUSICK, B.C., THOMAS, D.L., GOTTFREDSON, R.G., ZELINSKY, R.D., BERGER, Y.M. A comparison of transcervical and laparoscopic intrauterin artificial insemination techniques on reproductive perforamnce of ewes. (Department of Animal Sciences, Arlington Agricultural Research Station, and Spooner Agricultural Research Station University of Wisconsin-Madison, unpublished)

149. MENCHACA, A., VILARINO, M., CRISPO, V., PINCZAK, A., RUBIANES, E. (2007): Day 0 protocol: superstimulatory treatment initiated in the absence of a large follicle improves ovarian response and embryo yield in goats. *Theriogenology*. 68. 1111–1117.
150. MEYER, D.J., HARVEY, J.W. (1998): Evaluation of hepatobiliary system and skeletal muscle and lipid disorders. In: *Veterinary Laboratory Medicine. Interpretation and diagnosis*. Meyer, D.J., Harvey, J. W. (eds.) 2nd edition. W. B. Saunders company Philadelphia, London, Toronto, Montreal, Sydney, Tokyo. 157- 187.
151. MOAWAD, A. R., AMARNATH, D., CHOI, I., FISHER, P., ZHU, J., CAMPBELL, K.H.S. (2008): Vitrification of immature ovine oocytes with Cryoloop: Effect on in vitro fertilization rates. *Cryobiology*. 57. 3. 323.
152. MOLLO, M.R., RUMPF, R., MARTINS, A.C., CARRIJO, L.H.D., SAUERESSIG, M.G., SARTORI, R. (2007): Embryo production in superovulated Nelore heifers under low or high feed intake (abstract). *Acta Sci. Vet.* 35. suppl.3. 1241.
153. MOREIRA, F., PAULA- LOPES, F.F., HANSEN, P.J., BADINGA, L., THATCHER, W.W. (2002): Effects of growth hormones and insulin- like growth faktor- 1 on development o fin vitro derived bovine embryos. *Theriogenology*. 57. 895- 907.
154. MORENO, S.J., BULNES, G.A., BRUNET, G.A., COCERO, M.J. CAMPO, D., GARCIA, G., SEBSTIAN, L.A. (2001): Procedure for successful interspecies embryo transfer from mouflon (*Ovis musimon*) to Spanish merino sheep (*Ovis aries*). *J. Zoo. Wildl. Med.* 32. 336-341.
155. MYERS, N. MITTERMEIER R.A., MITTERMEIER, C.G., DA FONSECA, G.A.B., KENT, J. (2000): Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature*. 403. 853-858.

156. NAITANA, S., DATTENA, M., GALLUS, M., LOI, P., BRANCA, A., LEDDA, S., CAPPAL, P. (1995): Recipient synchronisation affects viability of vitrified ovine blastocysts. *Theriogenology*. 43. 1371-1378.
157. NICHOLAS, F.N., SMITH, C. (1983): Increased rates of genetic change in dairy cattle by embryo transfer and splitting. *Anim. Prod.* 36. 341–353.
158. NIEMANN, H., SACHER, B., ELSAESSER, F. (1985): Pregnancy rates relative to recipient plasma progesterone levels on the day of non- surgical transfer of frozen/ thawed bovine embryos. *Theriogenology*. 23. 631-639.
159. NIEMANN, H., RATH, D. (2001): Progress in reproductive biotechnology in swine. *Theriogenology*. 56. 1291-1304.
160. NOMA, A., OKABE, H., KITA, M. (1973): A new colorimetric micro-determinatoin of free fatty acids in serum. *Clin. Chim. Acta.* 43. 317-320.
161. NORTHEY, D.L., BARNES, F., EYESTONE, W.H., FIRST, N.L. (1985): Relationship of serum progesterone, luteinizing hormone and the incidence of pregnancy in bovine embryo transfer recipients. *Theriogenology*. 23. 214. (abstract)
162. NUTI, L.C., MINHAS, B.S., BAKER, W.C., CAPEHART, J.S., MARRACK, P. (1987): Superovulation and recovery of zygotes from Nubian and Alpine dairy goats. *Theriogenology*. 28. 481-488.
163. NUTI, I. (2007): Techniques for artificial insemination of goats. In: Youngquist, R. S. - Threlfall, W. R. (eds) *Current Therapy in Large Animal Theriogenology*. 2nd edition. Saunders- Elsevier, St. Louis, MO. 2007. 529–534.

164. O' CALLAGHAN, D., YAAKUB, H., HYTTEL, P., SPICER, L.J., BOLAND, M.P. (2000): Effect of nutrition and superovulation on oocyte morphology, follicular fluid composition and systemic hormone concentrations in ewes. *J. Reprod. Fertil.* 118. 303-313.
165. OBA, M., MIYASHITA, S., NISHII, R., KOIWA, M., KOYAMA, H., AMBROSE, D.J., DOCHI, O. (2013): Short communication: Effects of serum obtained from dairy cows with low or high body condition score on in vitro embryo development. *J Dairy Sci.* 96. 1668- 1671.
166. OLÁH J. (2010): A juhondó minőségét befolyásoló tényezők. Doktori (Ph.D.) értekezés. Debreceni Egyetem Agrár és Gazdálkodástudományok Centruma, Mezőgazdaság-, Élelmiszertudományi és Környezetgazdálkodási Kar, Állattenyésztéstudományi Intézet. Debrecen.
167. PARKINSON, T. (2009): Artificial insemination of ewes. In: Noakes, D. E., Parkinson, T. J., England, G. C. W. (eds) *Veterinary Reproduction and Obstetrics*. 9th edition. Saunders- Elsevier, London, UK. 2009. 765–808.
168. PARR, R.A., DAVIS, I.F., FAIRCLOUGH, R.J., MILES, M.A. (1987): Overfeeding during early pregnancy reduces peripheral progesterone concentration and pregnancy rate in sheep. *J. Reprod. Fertil.* 80. 317- 320.
169. PARR, R.A., DAVIS, I.F., MILES, M.A., SQUIRES, T.J. (1993): Liver blood flow and metabolic clearance rate of progesterone in sheep. *Res. Vet. Sci.* 55. 311- 316.
170. de PAZ, P., SANCHEZ, A.J., FERNANDEZ, J.G., CARBAJO, M., DOMINGUEZ, J.C., CHAMORRO, C.A., ANEL, L. (1994): Sheep embryo cryopreservation by vitrification and conventional freezing. *Theriogenology*. 42. 2. 327-338.

171. PENDELTON, R.J., YOUNGS, C.R., RORIE, R.W., POOL, S.H., MEMON, M.A., GODKE, R.A. (1992): Follicle stimulating hormone versus pregnant mare serum gonadotrophin for superovulation of dairy goats. *Small Ruminant Research*. 8. 217-224.
172. PETHES G., KULCSÁR M., SÁNDOR L., SOÓS P., CSEH S. (1983): Efficiency control of embryo transfer by progesterone analysis in recipient heifers. *Acta Vet Hung*. 31. 4. 193-199.
173. PINTO, A.B., SCHLEIN, A.L., MOLEY, K.H. (2002): Preimplantation exposure to high insulin- like growth factor I concentrations results in increased resorption rates in vivo. *Hum. Reprod*. 17. 457- 462.
174. PRADHAN, R., OSHIMA, K., OCHIAI, Y., KOJIMA, T., YAMAMOTO, N., ELSHABRAWY GHANEM, M., NAKAGOSHI, N. (2008): Effect of total cholesterol, glucose and blood urea nitrogen on embryo quality in post-partum superovulated suckling Japanese Black cattle. *Reproductive Medicine and Biology*. 7.2. 55- 62.
175. PTAK, G., DATTENA, M., LOI, T., TISCHNER, M., CAPPAL, P. (1999): Ovum pick-up in sheep: efficiency of in vitro embryo production, vitrification and birth of offspring. *Theriogenology*. 52. 6. 1105-1114.
176. PTAK, G., CLINTON, M., BARBONI, B., MUZZEDDU, M., CAPPAL, P., TISCHNER, M., LOI, P. (2002): Preservation of the wild European muflon: the first example of genetic management using a complete program of reproductive biotechnologies. *Biol. Reprod*. 66. 796-801.

177. PTAK, G., TISCHNER, M., BERNABO, N., LOI, P. (2003): Donor- dependent developmental competence of oocytes from lambs subjected to repeated hormonal stimulation. *Biol. Reprod.* 69. 278- 285.
178. PTAK, G., MATSUKAWA, K., PALMIERI, C., DELLA SALDA, L., SCAPOLO, P.A., LOI, P. (2006): Developmental and functional evidence of nuclear immaturity in prepubertal oocytes. *Hum. Reprod.* 21. 2228-2237.
179. RADOSTITS, O.M., GAY, C.C., HINCHCLIFF, K.W., CONSTABLE, P.D. (eds.) (2007): *Veterinary Medicine, 10th edition. A textbook of the diseases of cattle, horses, sheep, pigs and goats.* 2065 pages. ISBN: 978- 0- 7020- 2777- 2.
180. RAE, M.T., KYLE, C.E., MILLER, D.W., HAMMOND, A.J., BROOKS, A.N., RHIND, S.M. (2002): The effects of undernutrition, in utero, on reproductive function in adult male and female sheep. *Anim. Reprod. Sci.* 72. 63- 71.
181. RALL, W.F. (1987): Factors affecting the survival of mouse embryos cryopreserved by vitrification. *Cryobiology.* 24. 387–402.
182. RALL, W.F., FAHY, G.M. (1985): Ice-free cryopreservation of mouse embryos at $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ by vitrification. *Nature.* 313. 573–575.
183. RHIND, S.M., MCMILLEN, S., MCKELVEY, W.A.C., RODRIGUEZ-HERREJON, F.F., MCNEILLY, A.S. (1989): Effect of the body condition of ewes on the secretion of LH and FSH and the pituitary response to gonadotrophin- releasing hormone. *J. Endocrinol.* 120. 497- 502.
184. RHIND, S.M., MCMILLEN, S.R., DUFF, E., KYLE, C.E., WRIGHT, S. (2000): Effect of long term feed restriction on seasonal endocrine changes in Soay sheep. *Physiol. Behav.* 71. 343–451.
185. RIIS, P.M., MADSEN, A. (1985): Thyroxine concentration and secretion rates in relation to pregnancy, lactation and energy balance in goats. *J. Endocrinol.* 107. 421–427.

186. REMSEN, L.G., ROUSSEL, J.D., KARIHALOO, L.K. (1982): Pregnancy rates relating to plasma progesterone levels in recipient heifers at day of transfer. *Theriogenology*. 18. 365- 372.
187. ROBINSON, J.J., ROOKE, J. A., MCEVOY, T.G. (2002): Nutrition for conception and pregnancy. In: Freer, M., Dove, H. (eds). *Sheep nutrition*. CAB International, Wallingford, UK. pp. 189-211.
188. ROBINSON, J.J., ASHWORTH, C.J., ROOKE, J.A., MITCHELL, L.M., MCEVOY, T.G. (2006): Nutrition and fertility in ruminant livestock. *Animal Feed Science and Technology*. 126. 259- 276.
189. RÖSCHLAU, P., BERNT, E., GRUBER, W. (1974): Enzymatische Bestimmung des Gesamt-Cholesterins im Serum. *J Clin Chem Clin Biochem* 12. 403-407.
190. RYAN, J.P., HUNTON, J. R., MAXWELL W.M. (1991): Increased production of sheep embryos following superovulation of Merino ewes with a combination of pregnant mare serum gonadotrophin and follicle stimulating hormone. *Reproduction, Fertility and Development*. 3. 5. 551 - 560.
191. SACKS, D.B. (1999): Carbohydrates. In: Burtis CA, Ashwood ER (eds) *Tietz textbook of clinical chemistry 3rd ed*. WB Saunders Co., Philadelphia, p. 785-787.
192. SALAMON S. (1976): *Artificial insemination of sheep*. Publicity Press, Chippendale, N.S.W. 2006.
193. SALAMON S., MAXWELL, M.C. (2000): Storage of ram semen. *Anim. Reprod. Sci.* 62. 77–111.
194. SALAMON S., GILLAN, L., EVANS, G., MAXWELL, M.C. (2004): Fertility of ram semen after 35 years of frozen storage. In: *Proceedings of the*

International Congress of Animal Reproduction, Porto Seguro, Brazil, August 2004.

195. SANG, T.S., SUNG, K.J., HONG, S.Y., OK, K.L., YHONG, H.S., WON, I.C., DOO, S.L., GWAN, S.L., JONG, K.C., YOUNG, W.L. (2008): Laparoscopy vs. laparotomy for embryo transfer to produce transgenic goats (*Capra hircus*). *J. Vet. Sci.* 9. 103- 107.
196. SANTOS, J.E.P., CERRI, R.L.A., SARTORI, R. (2008): Nutritional management of the donor cow. *Theriogenology*. 69. 88-97.
197. SARATH, T., MEHROTRA, S., AGARWAL, S.K., VARSHNEY, V.P., HOQUE, M., SHANKAR, U., SINGH, S.K. (2008): Effect of insulin administration on ovarian function and estrus induction in acyclic goats. *Animal Reproduction Science*. 108. 216- 225.
198. SAYRE, B. L., LEWIS, G. S. (1997): Fertility and ovum fertilization rate after laparoscopic or transcervical intrauterine artificial insemination of oxytocin-treated ewes. *Theriogenology*. 48. 2. 267-275.
199. SCHIEWE, M.C., BUSH, M., STUART, L.S., WILDT, D.E. (1984): Laparoscopic embryo transfer in domestic sheep: a preliminary study. *Theriogenology*. 22. 6. 675-682.
200. SHELTON, J.N., MOORE, N.W. (1966): Survival of fertilized eggs transferred to ewes after progesterone treatment. *J. Reprod. Fertil.* 11. 149-151.
201. SHIPLEY, C.F.B., BRIAN, C., MYLNE, M.J.A. (2007): Artificial insemination and embryo transfer in sheep. In: Youngquist, R.S.- Threlfall, W.R. (eds) *Current Therapy in Large Animal Theriogenology*. 2nd edition. Saunders-Elsevier, St. Louis, MO. 2007. 629–641.
202. SEEGER, K. (1973): Die laparoskopie, eine Technik zur Routineuntersuchung des Genitaltrakts beim. Schaf. *Tierarztl. Prox.* 1. 295-299.

203. SELVARAJU, S., AGARWAL, S.K., KARCHE, S.D., MAJUMDAR, A.C. (2003): Ovarian response, embryo production and hormonal profile in superovulated goats treated with insulin. *Theriogenology*. 59. 1459- 1468.
204. SENGER, P.L.(author) (2003): *Pathway to Pregnancy and Partuition*. 2003
205. SENN, B.J., RICHARDSON, M.E. (1992): Seasonal effects on caprine response to synchronisation of estrus and superovulatory treatment. *Theriogenology*. 371. 579-685.
206. SENOSY, W., ZAIN, A. E., ABDEL- RAZEK, A. R. K., UCHIZA, M., TAMEOKA, N., IZAIKE, Y., OSAWA, T. (2012): Association between energy status early postpartum and subsequent embryonic mortality in high-yielding recipient cows. *Animal Science Journal*. 83. 4. 284- 290.
207. SEREGI, J. (1997): Embrióátültetés. Egy anyának száz leánya. *Állattenyésztők Lapja*. 2. 3. 8.
208. SHELTON, J.N., MOORE, N.W. (1966): Survival of fertilized eggs transferred to ewes after progesterone treatment. *J. Reprod. Fertil*. 11. 149.
209. SHETAEWI, M.M., ROSS, T.T. (1991): Effects of concentrate supplementation and lasalocid on serum chemistry and hormone profiles in Rambouillet ewes. *Small Rumin. Res*. 4. 365–377.
210. SINCLAIR, K.D., SINCLAIR, L.A., ROBINSON, J.J. (2000): Nitrogen metabolism and fertility in cattle: I. Adaptive changes in intake and metabolism to diets differing in their rate of energy and nitrogen release in the rumen. *Journal of Animal Science*. 78. 2659–2669.
211. SIRISATHIEN, S., HERNANDEZ- FONSECA, H.J., BRACKETT, B.G. (2003): Influences of epidermal growth factor and insulin- like growth factor- 1 on bovine blastocyst development in vitro. *Anim. Reprod. Sci*. 77. 21-32.

212. SIRISATHIEN, S., BRACKETT, B.G. (2003): TUNEL analyses of bovine blastocysts after culture with EGF and IGF-1. *Mol. Reprod. Dev.* 65. 51- 56.
213. SMIDT, D., NIEMANN, H. (1999): Biotechnology in genetics and reproduction. *Livestock Production Science.* 59. 207-221.
214. SOLTI L., CRICHTON, E.G., LOSKUTOFF, N.M., CSEH S. (2000): Economical and ecological importance of indigenous livestock and the application of assisted reproduction to their preservation. *Theriogenology.* 53. 1. 149-162.
215. SONGSASEN, N., BUCKRELL, B.C., PLANTE, C., LEIBO, S.P. (1995): In Vitro and in Vivo Survival of Cryopreserved Sheep Embryos. *Cryobiology.* 32. 1. 78-91.
216. SOSA, C., ABECIA, J.A., CARRIQUIRY, M., FORCADA, F., MARTIN, G.B., PALACÍN, I., MEIKLE, A. (2009): Early pregnancy alters the metabolic responses to restricted nutrition in sheep. *Domestic Animal Endocrinology.* 36. 13-23.
217. SOUZA, M.I.L., BICUDO, S.D., URIBE-VELASQUEZ, L.F., RAMOS, A.A. (2002): Circadian and circannual rhythms of T3 and T4 secretions in Polwarth-Ideal rams. *Small Rumin. Res.* 46. 1-5.
218. STEFANI, J. S., PALHO, M.D.C., CHRISTMANN, L., ROSA, J.M., SILVEIRA, M.C., RODRIGUES, J.L. (1990): Laparoscopic versus surgical transfer of ovine embryos. *Theriogenology.* 33. 1. 330.
219. STUART, J.A., PAGE, M.M. (2010): Plasma IGF-1 is negatively correlated with body mass in a comparison of 36 mammalian species. *Mechanisms of ageing and development.* 131. 591- 598.

220. SZABADOS T., GERGÁTZ E., VITINGER E., GYÖKÉR E. (2005): A mesterséges termékenyítés eredményességének vizsgálata üzemi körülmények között egy juhtenyésztő magángazdaságban. *Állattenyésztés és Takarmányozás*. 54. 1. 27-36.
221. SZABADOS T. (2006): A cervikouterinális inszeminálás eredményességének vizsgálata juhászatokban. Ph.D. értekezés. Nyugat- Magyarországi Egyetem Mezőgazdaság- és Élelmiszertudományi Kar. Mosonmagyaróvár.
222. SZALAY I. (2004): Alternatív baromfitenyésztés és – tartás. Mezőgazda Kiadó, Budapest, 321.
223. ZELL, A., SHELTON, J. N. (1986): Sucrose dilution of glycerol from mouse embryos frozen rapidly in liquid nitrogen vapor. *Journal of Reproduction and Fertility*. 76. 401- 408.
224. ZELL, A., ZHANG, J., HUDSON R. (1990): Rapid cryopreservation of sheep embryos by direct transfer into liquid nitrogen vapour at - 180°C. *Reproduction, Fertility and Development*. 2. 613- 618.
225. ULLAH, N., ANWAR, M., ANDRABI, S.M.H. (2006): First successful interspecific embryo transfer between urial (*Ovis vignei*) and domestic sheep (*Ovis aries*) in Pakistan. In: *Proceedings of the 26th Int. Pak. Cong. Zool.*, Lahore, Pakistan, pp. 25-26. (Abstract)
226. TAFT, R., AHMAD, N., INSKEEP, E.K. (1996): Exogenous pulses of luteinizing hormone cause persistence of the largest bovine ovarian follicle. *J. Anim. Sci.*. 74. 2985–2991.
227. TASI, ZS., GERGÁTZ, E., RESLI, I., KALLÓ, M. (1980): Eljárás és berendezés természetesen és szinkronizáltan ivarzó, valamint szuperovuláltatott juhok inszeminálására vagy a nyitott cervixű juhok méhkezelésére. OTH. Szabadalmi bejelentés. 10.24-25/1980

228. TERVIT, H.R., GOOLD, P.G., JAMES, R.W. (1984): The insemination of sheep with fresh or frozen semen. *Proceedings of the New Zealand Society of Animal Production*. 144. 11-13.
229. THIBIER, M. (2000): The IETS statistics of embryo transfers in livestock in the world of the year 1999; a new record for bovine in- vivo derived embryos transferred. *Embryo Transfer Newsletter* 2000. 18. 24-28.
230. THIÉRY, J.C., CHEMINEAU, P., HERNANDEZ, X., MIGAUD, M., MALPAUX, B. (2002): Neuroendocrine interactions and seasonality. *Domes. Anim. Endocrin.* 23. 87-100.
231. TIETZ, N.W. (1987): *Fundamentals of clinical chemistry* 3rd edition. W.B. Saunders Company Philadelphia, pp. 676-679.
232. TIMISJARVI, J., OJUTKANGAS, V., ELORANTA, E., NIEMINEN, M., LEPPALUOTO, J., LIIMATAINEN, S., VUOLTEENAHO, O. (1994): Annual variations in serum thyroid-stimulating hormone and thyroid hormones and in their responses to thyrotropin-releasing hormone in the reindeer. *J. Endocrinol.* 141. 527–533.
233. TODINI, L., LUCARONI, A., MALFATTI, A., DEBENEDETTI, A., COSTARELLI, S. (1992): Andamento ormonale della concentrazione ematica degli ormoni tiroidei nella capra. Differenze fra maschi e femmine (Male-female differences in the annual profiles of the thyroid hormones blood level by the goat). *Atti. Soc. Ital. Sci. Vet.* 46. 169–173.
234. TODINI, L., MALFATTI, A., VALBONESI, A., TRABALZA- MARINUCCI, M., DEBENEDETTI, A. (2007): Plasma total T3 and T4 concentrations in goats at different physiological stages, as affected by the energy intake. *Small Ruminant Research*. 68. 285- 290.

235. TOTEY, S.M., PAWSHE, C.H., APPA RAO, K.B.C. (1996): In vitro maturation of buffalo oocytes: role of insulin and its interaction with gonadotrophins. *J Reprod Fertil.* 50. 113-9.
236. VALASI, I., LEONTIDES, L., MENEGATOS, I., AMARIDIS, G.S. (2007): Oestradiol concentration as a predictor of ovarian response in FSH stimulated ewe- lambs. *Animal Reproduction Science.* 102. 145- 151.
237. VAN HOECK, V., STURMEY, R.G., BERMEJO-ALVAREZ, P., RIZOS, D., GUTIERREZ-ADAN, A., LEESE, H.J., BOLS, P.E., LEROY, J.L. (2011): Elevated non-esterified fatty acid concentrations during bovine oocyte maturation compromise early embryophysiology. *Plos One.* 6. e23183.
238. VELAZQUEZ, M.A., NEWMAN, M., CHRISTIE, M.F., CRIPPS, P.J., CROWE, M.A., SMITH, R.F., DOBSON, H. (2005): The usefulness of a single measurement of insulin- like growth factor-1 as a predictor of embryo yield and pregnancy rates in a bovine MOET program. *Theriogenology.* 64. 1977- 1994.
239. VÉGH J., GULYÁS L., SZALKA E., NÉMETH A. (2007): Economic analysis of artificial insemination and induced ovulation in sheep. *Gazdálkodás. Szerkesztőség, Budapest, Hungary.* 51. 5. 19-27. 90.
240. VINOLES GIL, C. (2003): Effect of nutrition on follicle development and ovulation rate in the ewe. Doctoral Thesis. Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala.
241. WALKER, S.K., SMITH, D.H., FRENHAM, A., ASHMAN, R.J., SEAMARK, R.F. (1989): The use of synthetic GnRH treatment in the collection of sheep embryos. *Theriogenology.* 31. 741-752.
242. WALSH, S.W., MATTHEWS, D., BROWNE, J.A., FORDE, N., CROWE, M.A., MIHM, M., DISKIN, M., EVANS, A.C. (2012): Acute dietary restriction

- in heifers alters expression of genes regulating exposure and response to gonadotrophins and IGF in dominant follicles. *Anim. Reprod. Sci.* 133. 43- 51.
243. WARWICK, B. L., BARRY, R. O., HORLACHER, W. R. (1934): Results in mating rams to Angora female goats. *Proc. 27th Annu. M. Am. Soc. Anim. Prod.* 225-227.
244. WATSON, P.F. (1995): Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. *Reprod. Fertil. Dev.* 7. 871–891.
245. WHITLEY, N.C., MCFADIN- BUFF, E.L., KEISLER, D.H. (2000): Effect of insuline on feed intake and reproductive performance of well- nourished nulliparous ewes. *Theriogenology.* 54. 1049- 1054.
246. WHITTINGHAM, D. G., LEIBO, S. P., MAZUR, P. (1972): Survival of mouse embryos frozen to - 196°C and - 269°C. *Science.* 178. 411-414.
247. WHO. (2010): WHO Laboratory Manual for the Examination and Processing of Human Semen. Fifth edition. 2010. WHO, Geneva, Switzerland. 287.
248. WILDT, D.E. (1992): Genetic resource banks for conserving wildlife species: justification, examples and becoming organised on a global basis. *Animal Reproduction Science.* 28. 247- 257.
249. WILLADSEN, S., POLGE, C., ROWSON, L., MOOR, R. (1976): Deep freezing of sheep embryos. *Journal of Reproduction and Fertility.* 46. 151- 154.
250. WILLADSEN, S.M. (1977): Factors affecting the survival of sheep embryos during freezing and thawing. *Ciba Found. Symp.* 175–201.
251. WILLIAMS, A.H. (1984): Long term effects of nutrition of ewe lambs in the neonatal period. In: Lindsay, D.R., Pearce, D.T. (Eds.), *Reproduction in Sheep.*

Australian Academic Science and Australian Wool Corporation, Canberra. 272–273.

252. WINDORSKI, E.J., REDMER, D.A., LUTHER, J.S., BILSKI, J.J., KIRSCH, J.D., KRAFT, K.C., BOROWCZYK, E., VONNAHME, K.A., REYNOLDS L.P., GRAZUL-BILSKA A.T. (2007): Superovulation in sheep: number and weight of the corpora lutea and serum progesterone. Proceedings, Western Section, American Society of American Science Vol. 58. 2007.
253. WULSTER- RADCLIFFE, M., LEWIS, S.G. (2002): Development of a new transcervical artificial insemination method for sheep: effects of a new transcervical artificialinsemination catheter and transversing the cervix on semen quality and fertility. Theriogenology. 58. 7. 1361-1371.
254. http://users.atw.hu/pharmagenefarm/tortenet_gazd_adatai.htm
255. <http://www.toprams.com/lai.htm>
256. ZERON, Y., SKLAN, D., ARAV, A. (2002): Effect of polyunsaturated fatty acid supplementation on biophysical parameters and chilling sensitivity of ewe oocytes. Mol Reprod Dev. 61. 271- 278.
257. ZHANG, S., BLACHE, D., BLACKBERRY, M.A., MARTIN, G.B. (2004): Dynamics of the responses in secretion of luteinizing hormone, leptin and insulin following an acute increase in nutrition in mature male sheep. Reprod. Fert. Develop. 16. 823–829.

11. Publikációs jegyzék

Lektorált tudományos közlemények magyar nyelven:

VASS N. – JÁVOR A. – SOLTI L. – CSEH S. (2013): A juhtenyésztésben alkalmazott asszisztált reprodukciós technikák. Magyar Állatorvosok Lapja. 135. 400- 409. (IF: 0,146)

NOVOTNINÉ DANKÓ G.- GYIMÓTHY G.- OLÁH J.- KULCSÁR M.- MAGYAR K.- VASS N.- POSTA J.- BALOGH P.- JÁVOR A. (2012): Tavaszi- nyári reprodukciós folyamatok nyomon követése és takarmánykiegészítő hatásának vizsgálata juhnál. Magyar Állatorvosok Lapja. 134. 83-88. (IF: 0,146)

OLÁH J. – FAZEKAS G. – PÉCSI A. – VASS N. – KOVÁCS A. – JÁVOR A. (2009): Tárolási hőmérséklet hatása különböző fajtájú kosok ondójának minőségére. Acta Agraria Debreceniensis. 37. 75-79.

VASS N. – KLAMBAUER P. – JÁVOR A. – KERESZTES ZS. – CSEH S. (2009): Embrió mélyhűtés a vitroloop vitrifikációs technikával. Acta Agraria Debreceniensis 37. 81-83.

FAZEKAS G. – HARANGI S. – VASS N. – OLÁH J. (2009): A réti csík (*Misgurnus fossilis*) kora és növekedése. Acta Agraria Debreceniensis. 37. 37-44.

VASS N. – JÁVOR A. – BALOGH P. – CSEH S. (2010): A szuperovuláció és az embrióátültetés eredményességét befolyásoló tényezők. Szezon és hormonális háttér. Acta Agraria Debreceniensis. 40. 73- 76.

OLÁH J. – VASS N. – KUSZA SZ. – POSTA J. – HARCZA A. – PÉCSI A. – KOVÁCS A. – JÁVOR A. (2010): Tenyészkosok ugrási sorrendjének vizsgálata. Acta Agraria Debreceniensis. 40. 59-62.

Lektorált tudományos közlemények magyar folyóiratokban idegen nyelven:

KLAMBAUER P. – KERESZTES ZS. – KANYO K. – VARGA E. – KRISTON R. – VASS N. – JÁVOR A. – KONC J. – SOLTI L. – CSEH S. (2009): Vitrification of cleavage mouse embryos by cryoloop procedure. *Acta Veterinaria Hungarica*. 57. 3. 399-410. (IF: 0,642)

FAIGL V. – VASS N. – JÁVOR A. – KULCSÁR M. – SOLTI L. – CSEH S. (2012): Artificial insemination of small ruminants (Review). *Acta Veterinaria Hungarica*. 60. 1. 115- 129. (IF: 1,173)

Lektorált tudományos közlemények idegen nyelven:

GYURANECZ M. – DÉNES B. – HORNOK S. – KOVÁCS P. – HORVÁTH G. – JURKOVICH V. – VARGA T. – HAJTÓS I. – SZABÓ R. – MAGYAR T. – VASS N. – HOFMANN-LEHMANN R. – ERDÉLYI K. – BHIDE M. – DÁN Á. (2012): Prevalence of *Coxiella burnetii* in Hungary – screening of dairy cows, sheep, commercial milk samples and ticks. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 12. 8. 650- 653. (IF: 2,277)

Tudományos könyvfejezet magyar nyelven:

VASS N. (2008): Az állategészségügyi kérdések Kárpátalja és az észak-alföldi régió viszonylatában. In: Madai H. – Nábrádi A.: Kárpátalja bekapcsolódásának segítése az észak-alföldi régió gazdasági életébe. Lícium Art Kiadó, Debrecen. 173-183.

VASS N. – CZEGLÉDI L. – JÁVOR A. (2008): Az állati eredetű funkcionális élelmiszerek jelentősége a humán táplálkozásban. In: Nagy J. – Schmidt J. – Jávora A.: A jövő élelmiszerei és az egészség. ISBN: 978-963-9732-36-0, Debrecen 49-67.

VASS N. – JÁVOR A. – CSEH S. (2008): Asszisztált reprodukciós technikák a juhtenyésztésben. In: Kukovics S. – Jávora A.: A juhtenyésztés jelene és jövője az EU-ban. ISBN: 978-963-8030-58-0, Kiadó: Magyar Juhtejgazdasági Egyesület

(Herceghalom) és Debreceni Egyetem Agrár- és Műszaki Tudományok Centruma (Debrecen). 361-376.

OLÁH J. – FAZEKAS G. – VASS N. – PÉCSI A. – KOVÁCS A. – JÁVOR A. (2008): Dorper kosok nyáron végzett ondóvizsgálata. In: Kukovics S. – Jávor A.: A juhtenyésztés jelene és jövője az EU-ban. ISBN: 978-963-8030-58-0 Kiadó: Magyar Juhtejgazdasági Egyesület (Herceghalom) és Debreceni Egyetem Agrár- és Műszaki Tudományok Centruma (Debrecen). 337-346.

Konferencia kiadványok magyar nyelven:

VASS N. – JÁVOR A. – CSEH S. (2008): Az embrióátültetés alkalmazása a magyar juhtenyésztésben. XXXII. Óvári Tudományos Napok, 2008. 10. 09. CD kiadvány

OLÁH J. – VASS N. – PÉCSI T. – KOVÁCS A. – JÁVOR A. (2008): Cigája és barbadoszi kosok viselkedése az ugratások során. XVI. Ifjúsági Tudományos Fórum, Keszthely, 2008. 04. 03. CD kiadvány

MADAI H. – KUKOVICS S. – CSERHIDY T. – OLÁH J. – VASS N. – JÁVOR A. (2008): A magyar vágóbárány minősége. XXXII. Óvári Tudományos Napok, 2008. 10. 09. CD kiadvány

JÁVOR A. – NÁBRÁDI A. – FENYVES V. – MADAI H. – VASS N. (2008): A minőség és az ár kapcsolata a magyar vágóbárány értékesítésében. XXXII. Óvári Tudományos Napok, 2008. 10. 09. CD kiadvány

VASS N. – JÁVOR A. – CSEH S. (2010): A szuperovuláció és az embrióátültetés eredményességét befolyásoló tényezők. Szezon és hormonális háttér. 2010. januári Állatorvos-tudományi Akadémiai Beszámolók. Élettan, Biokémia, Kórélettan, Morfológia. SZIE-ÁOTK, 2010. január 25-28. 8.

VASS N. – JÁVOR A. – KOVÁCS A. – CSEH S. (2011): A juh asszisztált reprodukciója: az embrióátültetés eredményességét befolyásoló tényezőkkel és fagyasztott juh embriók beültetésével kapcsolatos vizsgálatok tapasztalatai. A Magyar Buiatrikus Társaság 21.

nemzetközi kongresszusa. 2011. 10. 12-15. Sümeg. Proceedings. 76- 81. ISBN: 978-963-87942-4-6

VASS N.- JÁVOR A.- FAIGL V.- KULCSÁR M.- JURKOVICH V.- BRYDL E.- HUSZENICZA GY.- CSEH S. (2011): Összefüggések a takarmányozás és a juh embrióátültető programok eredményessége között. 17. Szaporodásbiológiai Találkozó. 2011. 10. 28-29. Herceghalom. Proceedings. 29.

Konferencia kiadványok idegen nyelven:

VASS N. – CZEGLEDI L. – JAVOR A. (2008): Significance of functional foods of animal origin in human health. Simpozionul: 60 DE ANI DE CERCETARE ȘTIINȚIFICĂ ÎN DOMENIUL CREȘTERII ANIMALELOR, Timisoara, 2008. 05. 29-30. (szekció legjobb előadása díj)

JAVOR A. – CZEGLEDI L. – MADAI H. – VASS N. (2008): New trends in functional food of animal origin. International symposium risk factors for environment and food safety. Oradea, 2008. 11. 14-15. Analele Universitatii Din Oradea Fascicula: Ecotoxicologie, Zootehnie Si Tehnologii De Industrie Alimentara, Vol. 7, Anul 7, 2008. 264-271.

OLAH J. – VASS N. – PECSI T. – KOVÁCS A. – JAVOR A. (2008): Mating behaviour of rams at semen collection with artificial vagina. International symposium risk factors for environment and food safety. Oradea, 2008. 11. 14-15. Analele Universitatii Din Oradea Fascicula: Ecotoxicologie, Zootehnie Si Tehnologii De Industrie Alimentara, Vol. 7, Anul 7. 2008. 321- 326.

Konferencia absztraktok idegen nyelven:

KOVÁCS A. – SARLÓS P. – EGRSZEGI I. – OLÁH J. – RÉVAY T. – VASS N. – JÁVOR A. (2008): Improved sperm tail viability differentiation by coloured mounting medium. 16th International Congress on animal reproduction 2008. 07. 13-17. Budapest - Hungary. Poster Abstracts. In: *Reprod. Dom. Anim.* 43, Suppl. 3: p. 179. P460.

VASS N. – BALOGH P. – JÁVOR A. – KULCSÁR M. – HUSZENICZA GY. – CSEH S. (2010): Metabolic hormones, as a factor affecting the efficiency of superovulation and embryo transfer (ET) in sheep. Poster abstract. 13th annual conference of the European Society for Domestic Animal Reproduction. Eger, Hotel Eger & Park Congress Center, 2010. 09. 17-18.

VASS N. – BALOGH P. – JÁVOR A. – KULCSÁR M. – HUSZENICZA GY. – CSEH S. (2010): Changes in metabolic hormone profiles of donor and recipient ewes and their connection to the outcome of superovulation and embryo transfer. Poster abstract. 13th International Ruminant Reproduction Symposium, Anchorage, Alaska, USA, 2010. 09. 3-7. 79.

Egyéb publikációk:

KUKOVICS S. – MADAI H. – VASS N. – JÁVOR A. (2008): A magyar juh- és kecskeágazat helyzete és kilátásai. Magyar juhászat + kecsketenyésztés. Magyar Mezőgazdaság melléklete. 17. 3. 2-8.

VASS N. – OLÁH J. (2008): Centrum a gyakorlatért. Hajdú-Bihari Napló, 2008.06.06.

JÁVOR A. – NÁBRÁDI A. – KOVÁCS A. – KOMLÓSI I. – ÁRNYASI M. – KUSZA SZ. – FENYVES V. – CZEGLÉDI L. – MADAI H. – LAPIS M. – VASS N. (2009): Debreceni álláspont: A kiskérődző ágazat jövőjéről. Magyar Mezőgazdaság. 64. 8. 29-36.

VASS N. – OLÁH J. (2008): Inszeminátor képzés a Debreceni Egyetemen. Magyar juhászat + kecsketenyésztés. Magyar Mezőgazdaság melléklete. 17. 5. 8.

VASS N. (2010): Kiskérődzők Alaszkában. Magyar juhászat + kecsketenyésztés. Magyar Mezőgazdaság melléklete. 19. 10. 7-8.

JÁVOR A.- VASS N. (2011): A funkcionális élelmiszerek jelentősége a humán táplálkozásban. Magyar juhászat + kecsketenyésztés. Magyar Mezőgazdaság melléklete. 20. 6. 2-7.

VASS N.- KOVÁCS A.- CSEH S. (2012): Innovációs lehetőségek a hazai juhtenyésztésben. Magyar juhászat. Magyar mezőgazdaság melléklete. 21. 1. 4-5.

VASS N.- KUKOVICS S. (2012): Új kórokozó a juh és szarvasmarha tenyésztésben: a Schmallenberg vírus. Magyar juhászat + kecsketenyésztés. Magyar Mezőgazdaság melléklete. 21. 4. 6- 8.

12. Ábrák jegyzéke

1. ábra: A BHB perifériás vérben mért szintjének alakulása a donorokban	70
2. ábra: A NEFA perifériás vérben mért szintjének alakulása a donorokban	71
3. ábra: A koleszterol perifériás vérben mért szintjének alakulása a donorokban	71
4. ábra: A karbamid perifériás vérben mért szintjének alakulása a donorokban	72
5. ábra: Az AST perifériás vérben mért szintjének alakulása a donorokban	72
6. ábra: A donorok TP plazmaszint alakulása	73
7. ábra: A progeszteron (P4) D3 napi perifériás vérben mért szintje és a sárgatestszám közötti összefüggések donor anyajuhokban	77
8. ábra: A koleszterol D0 és D3 napi perifériás vérben mért szintje és a sárgatestszám közötti összefüggések donor anyajuhokban	77
9. ábra: Az AST D2 napi perifériás vérben mért szintje és a sárgatestszám közötti összefüggések donor anyajuhokban	78
10. ábra: A sárgatestszám és a karbamid D0 napi perifériás vérben mért szintje közötti összefüggések donor anyajuhokban	78
11. ábra: A progeszteron (P4) perifériás vérben mért szintje a D3 napon és a donor anyajuhokból kinyert embriók száma közötti összefüggések	79
12. ábra: A koleszterol D0, D2 és D3 napi perifériás vérben mért szintje és a kinyert embriók száma közötti összefüggések donor anyajuhokban	79
13. ábra: A kinyert embriók száma és a NEFA D0, D2 és D3 napi értéke közötti összefüggések donorokban	80
14. ábra: A karbamid D0 napi perifériás vérben mért szintje és a donorokból kinyert, illetve átültetésre alkalmas embriók száma közötti összefüggések	80
15. ábra: A donor anyajuhokból kinyert embriók száma és az AST D2 napi perifériás vérben mért szintje közötti összefüggések	81
16. ábra: A koleszterol D0 és D2 napi szintje és az átültetésre alkalmas embriók száma közötti összefüggések donorokban	81
17. ábra: Az átültetésre alkalmas embriók száma és a NEFA D3 napi értéke közötti összefüggések donor anyajuhokban	82
18. ábra: A progeszteron (P4) D3 és a BHB D0 napi szintje közötti összefüggések donor anyajuhokban	82
19. ábra: A P4 (D3) és az AST D2 napi szintje közötti összefüggések donorokban	83

20. ábra: A T4 perifériás vérben mért szintje vemhes és nem vemhes recipiensekben a D0 napon (2009. február)	84
21. ábra: A P4 D2 és D3 napi szintje és a kinyert embriók száma közötti összefüggés donorokban (2009. február)	85
22. ábra: A kinyert embriók száma és a T4 D2 napi perifériás vérben mért szintjének kapcsolata donorokban (2009. február)	85
23. ábra: A kinyert embriók száma és az IGF-1 D0 napi értéke közötti összefüggések donor anyajuhokban (2009. február)	86
24. ábra: A sárgatestszám és a progeszteron (P4) D3 napi szintje közötti összefüggések donorokban (2009. február)	86
25. ábra: A sárgatestszám és a T4 D2 napi szintje közötti kapcsolat donorokban (2009. február)	87
26. ábra: A recipiensek inzulin szintje és a vemhesülés közötti kapcsolat (2010. február) a D0 és D2 napon	87
27. ábra: A kinyert embriók száma és a progeszteron (P4) D0 és D3 napi értéke közötti összefüggések donorokban (2010. február)	88
28. ábra: A kinyert embriók száma és az IGF-1 D0 és D3 napi szintje közötti összefüggések donor anyajuhokban (2010. február)	88
29. ábra: A sárgatestszám és progeszteron (P4) D0 és D3 napi szintje közötti kapcsolat donorokban (2010. február)	89
30. ábra: A donor anyajuhok sárgatestszáma és az IGF-1 perifériás vérben mért szintje közötti összefüggések a D2 és D3 napokon (2010. február)	89
31. ábra: A recipiens anyajuhok inzulin szintje és a vemhesülés közötti kapcsolat (2009. és 2010. február összevonva) a D0 és D2 napokon	91
32. ábra: A kinyert embriók száma és a progeszteron (P4) D2 és D3 napi vérben mért szintje közötti összefüggések donorokban (2009. és 2010. összevont eredmények)	91
33. ábra: A kinyert embriók száma és a T4 perifériás vérben mért szintjének kapcsolata donorokban a D2 napon (2009. és 2010. összevont eredmények)	92
34. ábra: A sárgatestek száma és a progeszteron (P4) D2 és D3 napi vérben mért szintje közötti összefüggések donorokban (2009. és 2010. összevont eredmények)	92
35. ábra: A sárgatestek száma és a T4 D2 napi perifériás vérben mért szintjének kapcsolata donorokban (2009. és 2010. összevont eredmények)	93

36. ábra: Az IGF-1 perifériás vérben mért szintje szezonban és szezonon kívül (donor)	94
37. ábra: A T3 perifériás vérben mért szintje szezonban és szezonon kívül (donor)	94
38. ábra: A T4 perifériás vérben mért szintje szezonban és szezonon kívül (donor)	95
39. ábra: A P4 perifériás vérben mért szintje szezonban és szezonon kívül (recipiens)	96
40. ábra: Az IGF-1 perifériás vérben mért szintje szezonban és szezonon kívül (recipiens)	96
41. ábra: A T4 perifériás vérben mért szintje szezonban és szezonon kívül (recipiens)	97
42. ábra: Az inzulin perifériás vérben mért szintje szezonban és szezonon kívül (recipiens)	97

13. Táblázatok jegyzéke

1. táblázat:	A donor és recipiens anyajuhokban alkalmazott kezelési (szuperovuláció, ivarzás-szinkronizálás) és mintagyűjtési protokoll	48
2. táblázat:	A donor anyajuhok embriókinyerési eredményei a 2009. februári programban	57
3. táblázat:	A recipiens anyajuhok embrióátültetési adatai, 2009. február	58
4. táblázat:	A 2009. februári ET program vemhességvizsgálati és ellési eredményei	59
5. táblázat:	A donor anyajuhok embriókinyerési eredményei a 2009. áprilisi programban	61
6. táblázat:	A recipiens anyajuhok embrióátültetési adatai, 2009. április	61
7. táblázat:	A donor anyajuhok embriókinyerési eredményei a 2010. februári programban	62
8. táblázat:	A 2010. februári program recipiens anyajuhainak ültetési adatai	63
9. táblázat:	A 2010. februári program ultrahangos vemhességvizsgálati és ellési eredménye (donor és recipiens)	64
10. táblázat:	A donor anyajuhok embriókinyerési eredményei a 2010. áprilisi programban	66
11. táblázat:	A 2010. áprilisi program recipiens állatainak EÁ adatai	67
12. táblázat:	A 2010. áprilisi program ultrahangos vemhességvizsgálati és ellési eredménye (donor és recipiens)	68
13. táblázat:	A 2009-ben és 2010-ben szezonon kívüli időszakban szuperovuláltatott donor anyajuhok embriókinyerési eredményei	74
14. táblázat:	A 2009. és 2010. áprilisi program donor állataiból vett vérminták anyagforgalmi paramétereinek vizsgálati eredményei- összefoglalás	76
15. táblázat:	A donorok és recipiensek átlagos, összefoglaló eredményei programonként	99

14. Rövidítések jegyzéke

ART: asszisztált reprodukciós technikák
AST/GOT: aszpartát-aminotranszferáz
BHB: beta hidroxy butirate/béta-hidroxi-vajsav
CL: corpus luteum, sárgatest
D: donor
D0 minta: a termékenyítés/ ivarzás időpontjában vett vérminta
D2 minta: az éheztetés kezdetén vett vérminta
D3 minta: az embriókinyerés/embrióátültetés idejében vett vérminta
DE: Debreceni Egyetem
DMSO: dimethyl-sulfoxid
DNS: deoxiribonukleinsav
EÁ: embrióátültetés
ET: embrió transzfer
eCG: eqine chorionic gonadotrophin
FSH: folliculus stimuláló hormon
GH: növekedési hormon
GnRH: gonadotrop releasing hormon
hCG: human Chorionic Gonadotropin
IGF-1: insulin-like growth factor 1
IGFBP: IGF-1 kötőfehérje
i.m.: intramuscularis, izomba
INRA: French National Institute for Agricultural Research
IVMFC: In Vitro Matured, Fertilized and Cultured
JIVET: juvenile in vitro embryo transfer
LH: luteinizáló hormon
LR³IGF-1: IGF-1 analóg
MOET: multiple ovulation and embryo transfer
MT: mesterséges termékenyítés
Na-EDTA: nátrium etilén-diamin-tetraecetsav
NEB: negatív energia balansz/egyensúly
NEFA: non esterified fatty acids/nem észterifikált zsírsavak
NKTH: Nemzeti Kutatási és Technológiai Hivatal

OPS: open-pulled straws

OPU: ovum pick up

P4: progeszteron

PBS: phosphate buffered saline

PGD: pre-implantációs genetikai diagnózis

PGF2alfa: prostaglandin F2alfa

PMSG: pregnant mare serum gonadotrophin

R: recipiens

s. c.: subcutan, bőr alá

SZIE-ÁOTK: Szent István Egyetem Állatorvos-tudományi Kar

T3: trijód-tironon

T4: tiroxin

TP: total protein/összfehérje

15. Köszönetnyilvánítás

Szeretném megköszönni mindazok segítségét, akik segítettek munkámat a kísérletek megvalósításában, dolgozatom megírásában és támogatták szakmai előmeneteletemet:

Köszönettel tartozom témavezetőimnek, Prof. Dr. Cseh Sándornak és Prof. Dr. Jávor Andrásnak, akik támogatására és segítségére Ph.D. hallgatói, predoktori tevékenységem alatt, és az azóta eltelt időben is bármikor számíthattam/számíthatok. Munkám elkészülése során nyújtott tudományos, szakmai és anyagi támogatásukat köszönöm. Külön köszönettel tartozom Prof. Dr. Jávor Andrásnak, aki elindított a tudományos pályán.

Külön köszönettel tartozom Prof. Dr. Cseh Sándornak, aki szakmai tudását megosztotta Velem, és értékes tanácsokkal látott el a munka gyakorlati megvalósítása során.

Köszönöm Prof. Dr. Huszenicza Gyula† kísérletek megtervezésében nyújtott segítségét, szakmai támogatását.

Köszönöm Prof. Dr. Kovács András mindenkori szakmai segítségét, hasznos tanácsait, és a kísérletek végrehajtásához szükséges anyagi háttér biztosítását (A „Piaci igényeknek és az éghajlatnak megfelelő juhok tenyésztése és nemesítése” című NKTH projekt).

Köszönöm a mindenkori támogatást és ösztönzést Családomnak, akik mindig mellettem állnak.

A vizsgálatok lebonyolításában, az eredmények értékelésében segítettek, és értékes szakmai tanácsokkal láttak el: Dr. Faigl Vera, Dr. Kulcsár Margit, Dr. Oláh János, Dr. Balogh Péter, Dr. Pálfy Tamás.

Köszönöm a mindennemű támogatást a DE Mezőgazdaság-, Élelmiszertudományi és Környezetgazdálkodási Kar Állattudományi, Biotechnológiai és Természetvédelmi Intézet volt és jelenlegi Tanszékvezetőjének, Dr. Mihók Sándornak és Dr. Komlósi Istvánnak és az Intézet valamennyi dolgozójának.

Hálás köszönettel tartozom a Szücs- Juh Kft., valamint a Debreceni Egyetem kismacsi Kísérleti Telep valamennyi dolgozójának, a munkám elvégzésében nyújtott segítségért.

16. Nyilatkozatok

NYILATKOZAT

Ezen értekezést a Debreceni Egyetem Mezőgazdaság-, Élelmiszertudományi és Környezetgazdálkodási Karán, az Állattenyésztési Tudományok Doktori Iskola keretében készítettem, a Debreceni Egyetem doktori (Ph.D.) fokozatának elnyerése céljából.

Debrecen, 2014. 01. 03.

.....
a jelölt aláírása

NYILATKOZAT

Tanúsítom, hogy Dr. Pálfyné Dr. Vass Nóra doktorjelölt 2007-2010 között a fent megnevezett Doktori Iskola keretében irányításommal/irányításunkkal végezte munkáját. Az értekezésben foglalt eredményekhez a jelölt önálló alkotó tevékenységével meghatározóan hozzájárult, az értekezés a jelölt önálló munkája. Az értekezés elfogadását javaslom/javasoljuk.

Debrecen, 2014. 01. 03.

.....
a témavezetők aláírása

17. Mellékletek

17. 7. melléklet: T- teszt, recipiensek vemhesülés (2009. és 2010. összevonva)

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
									Lower	Upper
P4_D0	Equal variances assumed	1,251	0,277	0,957	20	0,350	0,22735	0,23759	-0,26825	0,72295
	Equal variances not assumed			1,069	18,834	0,299	0,22735	0,21276	-0,21823	0,67293
P4_D2	Equal variances assumed	1,546	0,227	1,013	21	0,323	0,52769	0,52098	-0,55574	1,61112
	Equal variances not assumed			1,139	14,324	0,274	0,52769	0,46342	-0,46413	1,51952
P4_D3	Equal variances assumed	0,629	0,437	0,564	21	0,579	1,16192	2,06176	-3,12575	5,44960
	Equal variances not assumed			0,618	17,409	0,545	1,16192	1,88138	-2,80034	5,12419
IGF1_D0	Equal variances assumed	0,769	0,391	0,302	20	0,766	6,79624	22,50630	-40,15107	53,74355
	Equal variances not assumed			0,291	14,987	0,775	6,79624	23,37565	-43,03162	56,62410
IGF1_D2	Equal variances assumed	0,150	0,702	0,334	21	0,741	6,51108	19,46787	-33,97457	46,99672
	Equal variances not assumed			0,337	20,082	0,739	6,51108	19,30310	-33,74397	46,76613
IGF1_D3	Equal variances assumed	0,108	0,746	1,136	21	0,269	21,72831	19,12243	-18,03895	61,49557
	Equal variances not assumed			1,143	19,920	0,267	21,72831	19,00954	-17,93510	61,39172
T3_D0	Equal variances assumed	0,306	0,586	0,329	20	0,746	0,09410	0,28625	-0,50301	0,69121
	Equal variances not assumed			0,366	19,041	0,719	0,09410	0,25731	-0,44438	0,63259
T3_D2	Equal variances assumed	1,287	0,269	-0,393	21	0,698	-0,10362	0,26380	-0,65222	0,44498
	Equal variances not assumed			-0,366	13,294	0,720	-0,10362	0,28340	-0,71448	0,50725
T3_D3	Equal variances assumed	0,134	0,718	0,045	21	0,964	0,00738	0,16260	-0,33077	0,34554
	Equal variances not assumed			0,046	20,734	0,963	0,00738	0,15908	-0,32369	0,33846
T4_D0	Equal variances assumed	2,575	0,124	-1,426	20	0,169	-13,78991	9,67316	-33,96777	6,38794
	Equal variances not assumed			-1,553	19,827	0,136	-13,78991	8,87902	-32,32157	4,74174
T4_D2	Equal variances assumed	0,757	0,394	-1,078	21	0,293	-11,85215	10,99703	-34,72174	11,01743
	Equal variances not assumed			-1,009	13,800	0,330	-11,85215	11,74141	-37,06922	13,36491
T4_D3	Equal variances assumed	2,456	0,132	-1,114	21	0,278	-23,86869	21,41668	-68,40711	20,66973
	Equal variances not assumed			-1,007	11,093	0,336	-23,86869	23,70948	-75,99941	28,26203
INS_D0	Equal variances assumed	10,154	0,005	1,794	20	0,088	5,50385	3,06843	-0,89679	11,90448
	Equal variances not assumed			2,023	18,198	0,058	5,50385	2,72010	-0,20642	11,21411
INS_D2	Equal variances assumed	0,120	0,733	1,879	21	0,074	2,84338	1,51350	-0,30411	5,99088
	Equal variances not assumed			1,910	20,520	0,070	2,84338	1,48848	-0,25650	5,94327
INS_D3	Equal variances assumed	4,764	0,041	0,073	21	0,942	0,04785	0,65425	-1,31275	1,40844
	Equal variances not assumed			0,079	19,079	0,938	0,04785	0,60660	-1,22142	1,31711
IGF1_D2_D3	Equal variances assumed	0,080	0,780	-1,707	21	0,102	-15,21723	8,91248	-33,75175	3,31729
	Equal variances not assumed			-1,694	18,883	0,107	-15,21723	8,98534	-34,03166	3,59719
IGF1_D0_D2	Equal variances assumed	1,662	0,212	0,766	20	0,453	9,44538	12,32766	-16,26965	35,16042
	Equal variances not assumed			0,722	13,677	0,483	9,44538	13,08413	-18,67955	37,57032
IGF1_D0_D3	Equal variances assumed	2,324	0,143	-0,422	20	0,677	-5,85162	13,85110	-34,74452	23,04127
	Equal variances not assumed			-0,392	12,774	0,702	-5,85162	14,93793	-38,18119	26,47794
INS_D0_D2	Equal variances assumed	2,518	0,128	0,989	20	0,334	2,86513	2,89666	-3,17719	8,90745
	Equal variances not assumed			1,049	19,911	0,307	2,86513	2,73112	-2,83351	8,56377
INS_D0_D3	Equal variances assumed	10,597	0,004	1,711	20	0,103	5,49778	3,21406	-1,20664	12,20220
	Equal variances not assumed			1,931	18,157	0,069	5,49778	2,84752	-0,48093	11,47648
INS_D2_D3	Equal variances assumed	0,078	0,783	1,603	21	0,124	2,79554	1,74412	-0,83156	6,42264
	Equal variances not assumed			1,651	20,933	0,114	2,79554	1,69372	-0,72744	6,31851

17. 8. melléklet: T- teszt, recipiensek vemhesülés (2009)

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
									Lower	Upper
P4_D0	Equal variances assumed	0,552	0,486	0,201	6	0,847	0,06200	0,30792	-0,69146	0,81546
	Equal variances not assumed			0,185	3,368	0,864	0,06200	0,33511	-0,94151	1,06551
P4_D2	Equal variances assumed	6,142	0,042	0,363	7	0,727	0,14600	0,40194	-0,80444	1,09644
	Equal variances not assumed			0,395	5,727	0,707	0,14600	0,36919	-0,76791	1,05991
P4_D3	Equal variances assumed	0,152	0,708	-0,003	7	0,997	-0,00650	1,90970	-4,52223	4,50923
	Equal variances not assumed			-0,003	6,695	0,997	-0,00650	1,89930	-4,53945	4,52645
IGF1_D0	Equal variances assumed	2,476	0,167	0,221	6	0,832	8,96533	40,50742	-90,15275	108,08341
	Equal variances not assumed			0,178	2,417	0,872	8,96533	50,28912	-175,27038	193,20105
IGF1_D2	Equal variances assumed	1,825	0,219	-0,062	7	0,953	-1,60350	25,97477	-63,02407	59,81707
	Equal variances not assumed			-0,057	4,003	0,957	-1,60350	28,25506	-80,02717	76,82017
IGF1_D3	Equal variances assumed	2,968	0,129	0,346	7	0,739	8,11200	23,44310	-47,32212	63,54612
	Equal variances not assumed			0,318	3,966	0,767	8,11200	25,53770	-63,03430	79,25830
T3_D0	Equal variances assumed	0,070	0,800	0,073	6	0,944	0,01467	0,20193	-0,47945	0,50878
	Equal variances not assumed			0,072	4,164	0,946	0,01467	0,20467	-0,54489	0,57422
T3_D2	Equal variances assumed	6,169	0,042	-1,056	7	0,326	-0,57350	0,54292	-1,85730	0,71030
	Equal variances not assumed			-0,935	3,139	0,416	-0,57350	0,61355	-2,47816	1,33116
T3_D3	Equal variances assumed	1,324	0,288	-0,816	7	0,441	-0,19000	0,23288	-0,74067	0,36067
	Equal variances not assumed			-0,756	4,221	0,490	-0,19000	0,25129	-0,87350	0,49350
T4_D0	Equal variances assumed	0,857	0,390	-2,419	6	0,052	-30,27533	12,51699	-60,90329	0,35263
	Equal variances not assumed			-2,916	5,861	0,028	-30,27533	10,38293	-55,82825	-4,72242
T4_D2	Equal variances assumed	2,976	0,128	-1,361	7	0,216	-33,97950	24,97161	-93,02797	25,06897
	Equal variances not assumed			-1,244	3,863	0,284	-33,97950	27,31164	-110,87840	42,91940
T4_D3	Equal variances assumed	2,231	0,179	-1,233	7	0,257	-63,58400	51,55724	-185,49750	58,32950
	Equal variances not assumed			-1,120	3,689	0,330	-63,58400	56,78988	-226,63656	99,46856
INS_D0	Equal variances assumed	7,938	0,030	0,063	6	0,952	0,09867	1,57303	-3,75040	3,94774
	Equal variances not assumed			0,048	2,206	0,965	0,09867	2,04165	-7,94481	8,14215
INS_D2	Equal variances assumed	0,266	0,622	0,850	7	0,424	0,86550	1,01871	-1,54336	3,27436
	Equal variances not assumed			0,811	5,130	0,453	0,86550	1,06692	-1,85629	3,58729
INS_D3	Equal variances assumed	1,383	0,278	-0,182	7	0,860	-0,23450	1,28559	-3,27443	2,80543
	Equal variances not assumed			-0,197	5,964	0,850	-0,23450	1,18781	-3,14528	2,67628
IGF1_D2_D3	Equal variances assumed	0,250	0,633	-0,907	7	0,395	-9,71550	10,71555	-35,05375	15,62275
	Equal variances not assumed			-0,953	6,833	0,373	-9,71550	10,19310	-33,93855	14,50755
IGF1_D0_D2	Equal variances assumed	0,106	0,756	1,151	6	0,294	27,01467	23,47280	-30,42121	84,45055
	Equal variances not assumed			1,127	4,071	0,322	27,01467	23,96674	-39,07000	93,09934
IGF1_D0_D3	Equal variances assumed	0,102	0,760	0,682	6	0,521	19,11333	28,01534	-49,43773	87,66439
	Equal variances not assumed			0,625	3,336	0,572	19,11333	30,58890	-72,90963	111,13630
INS_D0_D2	Equal variances assumed	0,894	0,381	-0,243	6	0,816	-0,32933	1,35351	-3,64125	2,98258
	Equal variances not assumed			-0,264	5,469	0,801	-0,32933	1,24589	-3,45107	2,79240
INS_D0_D3	Equal variances assumed	0,603	0,467	0,422	6	0,688	0,71733	1,70066	-3,44403	4,87870
	Equal variances not assumed			0,367	2,896	0,739	0,71733	1,95653	-5,63816	7,07283
INS_D2_D3	Equal variances assumed	5,528	0,051	0,593	7	0,572	1,10000	1,85348	-3,28279	5,48279
	Equal variances not assumed			0,650	5,464	0,542	1,10000	1,69180	-3,14023	5,34023

17. 9. melléklet: T- teszt, recipiensek vemhesülés (2010.)

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
		F	Sig.	t	df	Sig. (2- tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
									Lower	Upper
P4_D0	Equal variances assumed	1,971	0,186	1,146	12	0,274	0,35208	0,30732	-0,31751	1,02168
	Equal variances not assumed			1,298	8,842	0,227	0,35208	0,27122	-0,26312	0,96729
P4_D2	Equal variances assumed	1,899	0,193	0,954	12	0,359	0,75500	0,79136	-0,96923	2,47923
	Equal variances not assumed			1,096	7,977	0,305	0,75500	0,68905	-0,83473	2,34473
P4_D3	Equal variances assumed	1,104	0,314	0,603	12	0,558	1,83375	3,04314	-4,79669	8,46419
	Equal variances not assumed			0,681	8,999	0,513	1,83375	2,69218	-4,25650	7,92400
IGF1_D0	Equal variances assumed	0,019	0,894	0,566	12	0,582	10,68250	18,87312	-30,43849	51,80349
	Equal variances not assumed			0,577	11,611	0,575	10,68250	18,49983	-29,77551	51,14051
IGF1_D2	Equal variances assumed	0,468	0,507	0,566	12	0,582	10,20333	18,03334	-29,08793	49,49460
	Equal variances not assumed			0,614	11,262	0,551	10,20333	16,61840	-26,26983	46,67650
IGF1_D3	Equal variances assumed	0,152	0,703	1,447	12	0,173	29,11583	20,11533	-14,71170	72,94336
	Equal variances not assumed			1,471	11,501	0,168	29,11583	19,79253	-14,21696	72,44863
T3_D0	Equal variances assumed	0,607	0,451	0,452	12	0,659	0,18167	0,40210	-0,69444	1,05778
	Equal variances not assumed			0,501	10,128	0,627	0,18167	0,36231	-0,62423	0,98756
T3_D2	Equal variances assumed	0,531	0,480	0,770	12	0,456	0,20250	0,26283	-0,37016	0,77516
	Equal variances not assumed			0,805	11,994	0,437	0,20250	0,25163	-0,34578	0,75078
T3_D3	Equal variances assumed	0,756	0,401	0,590	12	0,566	0,13500	0,22867	-0,36323	0,63323
	Equal variances not assumed			0,639	11,388	0,536	0,13500	0,21140	-0,32837	0,59837
T4_D0	Equal variances assumed	0,028	0,870	-0,279	12	0,785	-2,92417	10,48262	-25,76384	19,91550
	Equal variances not assumed			-0,282	11,279	0,783	-2,92417	10,38434	-25,71120	19,86287
T4_D2	Equal variances assumed	5,460	0,038	0,335	12	0,743	2,66125	7,93916	-14,63670	19,95920
	Equal variances not assumed			0,383	8,327	0,711	2,66125	6,95053	-13,25772	18,58022
T4_D3	Equal variances assumed	0,016	0,902	0,244	12	0,811	2,46792	10,09548	-19,52825	24,46408
	Equal variances not assumed			0,243	10,745	0,812	2,46792	10,13961	-19,91407	24,84990
INS_D0	Equal variances assumed	4,447	0,057	2,666	12	0,021	9,15417	3,43418	1,67173	16,63661
	Equal variances not assumed			2,896	11,216	0,014	9,15417	3,16122	2,21271	16,09562
INS_D2	Equal variances assumed	0,623	0,445	1,828	12	0,093	4,05750	2,22018	-0,77985	8,89485
	Equal variances not assumed			1,815	10,649	0,098	4,05750	2,23492	-0,88137	8,99637
INS_D3	Equal variances assumed	5,335	0,039	0,377	12	0,713	0,25667	0,68125	-1,22765	1,74098
	Equal variances not assumed			0,428	8,685	0,679	0,25667	0,59974	-1,10758	1,62092
IGF1_D2_D3	Equal variances assumed	0,124	0,731	-1,412	12	0,183	-18,91250	13,39817	-48,10461	10,27961
	Equal variances not assumed			-1,379	9,910	0,198	-18,91250	13,71214	-49,50264	11,67764
IGF1_D0_D2	Equal variances assumed	1,281	0,280	0,033	12	0,974	0,47917	14,60811	-31,34916	32,30749
	Equal variances not assumed			0,031	7,977	0,976	0,47917	15,60294	-35,51940	36,47774
IGF1_D0_D3	Equal variances assumed	0,560	0,469	-1,250	12	0,235	-18,43333	14,74272	-50,55496	13,68829
	Equal variances not assumed			-1,179	8,278	0,271	-18,43333	15,63686	-54,28206	17,41539
INS_D0_D2	Equal variances assumed	2,176	0,166	1,286	12	0,223	5,09667	3,96471	-3,54170	13,73503
	Equal variances not assumed			1,323	11,825	0,211	5,09667	3,85099	-3,30768	13,50101
INS_D0_D3	Equal variances assumed	7,300	0,019	2,585	12	0,024	8,89750	3,44195	1,39813	16,39687
	Equal variances not assumed			2,834	10,802	0,017	8,89750	3,14000	1,97089	15,82411
INS_D2_D3	Equal variances assumed	0,696	0,420	1,632	12	0,129	3,80083	2,32842	-1,27235	8,87402
	Equal variances not assumed			1,614	10,455	0,136	3,80083	2,35441	-1,41434	9,01600

17. 10. melléklet: Összefüggésvizsgálatok (metabolikus hormonok és paraméterek, 2009. és 2010. szezonon kívüli időszak, donor állatok)

		Correlations																				
		P4_D0	P4_D2	P4_D3	IGF1_D0	IGF1_D2	IGF1_D3	T3_D0	T3_D2	T3_D3	T4_D0	T4_D2	T4_D3	INS_D0	INS_D2	INS_D3	IGF1_D2_D3	IGF1_D0_D2	IGF1_D0_D3	INS_D0_D2	INS_D0_D3	INS_D2_D3
P4_D0	Pearson Correlation	1	0,197	0,066	-0,523	-0,455	-0,391	-0,546	-0,512	-0,494	-0,232	0,254	-0,127	-0,496	0,183	0,007	-0,183	-0,503	-0,470	-0,543	-0,487	0,083
	Sig. (2-tailed)		0,540	0,837	0,081	0,137	0,209	0,066	0,089	0,103	0,467	0,425	0,693	0,101	0,569	0,982	0,569	0,095	0,123	0,068	0,108	0,798
	N	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
P4_D2	Pearson Correlation	0,197	1	0,690	-0,153	-0,156	0,260	-0,297	-0,023	-0,015	-0,027	-0,019	0,013	-0,205	-0,282	0,831	-0,421	-0,135	-0,263	-0,133	-0,537	-0,789
	Sig. (2-tailed)	0,540		0,013	0,635	0,628	0,415	0,348	0,943	0,963	0,935	0,954	0,967	0,524	0,375	0,001	0,173	0,676	0,409	0,681	0,072	0,002
	N	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
P4_D3	Pearson Correlation	0,066	0,690	1	0,285	0,226	0,101	0,094	0,306	0,126	0,219	-0,106	-0,098	0,195	-0,507	0,777	0,176	0,286	0,293	0,325	-0,125	-0,856
	Sig. (2-tailed)	0,837	0,013		0,370	0,480	0,756	0,771	0,334	0,696	0,494	0,743	0,762	0,543	0,093	0,003	0,584	0,368	0,355	0,302	0,698	0,000
	N	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
IGF1_D0	Pearson Correlation	-0,523	-0,153	0,285	1	0,870	0,563	0,823	0,569	0,712	0,615	-0,178	0,216	0,916	0,057	0,208	0,517	0,963	0,961	0,902	0,809	-0,136
	Sig. (2-tailed)	0,081	0,635	0,370		0,000	0,057	0,001	0,053	0,009	0,033	0,580	0,501	0,000	0,861	0,517	0,085	0,000	0,000	0,000	0,001	0,674
	N	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
IGF1_D2	Pearson Correlation	-0,455	-0,156	0,226	0,870	1	0,571	0,593	0,688	0,684	0,397	-0,224	0,103	0,645	0,028	0,164	0,664	0,706	0,809	0,638	0,562	-0,116
	Sig. (2-tailed)	0,137	0,628	0,480	0,000		0,053	0,042	0,013	0,014	0,202	0,483	0,749	0,024	0,930	0,609	0,019	0,010	0,001	0,026	0,057	0,720
	N	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
IGF1_D3	Pearson Correlation	-0,391	0,260	0,101	0,563	0,571	1	0,471	0,469	0,802	0,412	0,059	0,370	0,500	0,337	0,453	-0,235	0,498	0,311	0,414	0,304	-0,194
	Sig. (2-tailed)	0,209	0,415	0,756	0,057	0,053		0,122	0,124	0,002	0,183	0,855	0,236	0,098	0,284	0,139	0,462	0,100	0,325	0,181	0,337	0,546
	N	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
T3_D0	Pearson Correlation	-0,546	-0,297	0,094	0,823	0,593	0,471	1	0,399	0,640	0,700	-0,236	0,402	0,922	0,123	0,170	0,272	0,860	0,788	0,891	0,830	-0,074
	Sig. (2-tailed)	0,066	0,348	0,771	0,001	0,042	0,122		0,199	0,025	0,011	0,461	0,195	0,000	0,704	0,598	0,392	0,000	0,002	0,000	0,001	0,819
	N	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
T3_D2	Pearson Correlation	-0,512	-0,023	0,306	0,569	0,688	0,469	0,399	1	0,443	0,058	-0,034	-0,335	0,338	-0,059	0,306	0,387	0,443	0,497	0,353	0,205	-0,269
	Sig. (2-tailed)	0,089	0,943	0,334	0,053	0,013	0,124	0,199		0,150	0,857	0,918	0,286	0,283	0,856	0,333	0,214	0,149	0,100	0,260	0,522	0,398
	N	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
T3_D3	Pearson Correlation	-0,494	-0,015	0,126	0,712	0,684	0,802	0,640	0,443	1	0,460	-0,280	0,224	0,716	0,277	0,266	0,079	0,651	0,549	0,646	0,590	-0,076
	Sig. (2-tailed)	0,103	0,963	0,696	0,009	0,014	0,002	0,025	0,150		0,133	0,378	0,484	0,009	0,384	0,402	0,807	0,022	0,064	0,023	0,043	0,815
	N	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
T4_D0	Pearson Correlation	-0,232	-0,027	0,219	0,615	0,397	0,412	0,700	0,058	0,460	1	-0,140	0,498	0,659	-0,006	0,344	0,095	0,667	0,568	0,661	0,503	-0,274
	Sig. (2-tailed)	0,467	0,935	0,494	0,033	0,202	0,183	0,011	0,857	0,133		0,664	0,099	0,020	0,986	0,273	0,770	0,018	0,054	0,019	0,096	0,390
	N	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
T4_D2	Pearson Correlation	0,254	-0,019	-0,106	-0,178	-0,224	0,059	-0,236	-0,034	-0,280	-0,140	1	0,211	-0,191	0,326	-0,175	-0,320	-0,134	-0,224	-0,274	-0,115	0,295
	Sig. (2-tailed)	0,425	0,954	0,743	0,580	0,483	0,855	0,461	0,918	0,378	0,664		0,511	0,553	0,302	0,587	0,311	0,679	0,483	0,389	0,722	0,353
	N	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
T4_D3	Pearson Correlation	-0,127	0,013	-0,098	0,216	0,103	0,370	0,402	-0,335	0,224	0,498	0,211	1	0,367	0,076	0,034	-0,215	0,254	0,124	0,348	0,344	0,010
	Sig. (2-tailed)	0,693	0,967	0,762	0,501	0,749	0,236	0,195	0,286	0,484	0,099	0,511		0,240	0,814	0,916	0,502	0,426	0,702	0,268	0,273	0,976
	N	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
INS_D0	Pearson Correlation	-0,496	-0,205	0,195	0,916	0,645	0,500	0,922	0,338	0,716	0,659	-0,191	0,367	1	0,130	0,147	0,307	0,965	0,885	0,967	0,916	-0,053
	Sig. (2-tailed)	0,101	0,524	0,543	0,000	0,024	0,098	0,000	0,283	0,009	0,020	0,553	0,240		0,688	0,648	0,331	0,000	0,000	0,000	0,000	0,870
	N	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
INS_D2	Pearson Correlation	0,183	-0,282	-0,507	0,057	0,028	0,337	0,123	-0,059	0,277	-0,006	0,326	0,076	0,130	1	-0,196	-0,273	0,066	-0,048	-0,126	0,206	0,637
	Sig. (2-tailed)	0,569	0,375	0,093	0,861	0,930	0,284	0,704	0,856	0,384	0,986	0,302	0,814	0,688		0,542	0,390	0,839	0,882	0,696	0,520	0,026
	N	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
INS_D3	Pearson Correlation	0,007	0,831	0,777	0,208	0,164	0,453	0,170	0,306	0,266	0,344	-0,175	0,034	0,147	-0,196	1	-0,218	0,209	0,087	0,197	-0,263	-0,881
	Sig. (2-tailed)	0,982	0,001	0,003	0,517	0,609	0,139	0,598	0,333	0,402	0,273	0,587	0,916	0,648	0,542		0,496	0,515	0,789	0,539	0,409	0,000
	N	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
IGF1_D2_D3	Pearson Correlation	-0,183	-0,421	0,176	0,517	0,664	-0,235	0,272	0,387	0,079	0,095	-0,320	-0,215	0,307	-0,273	-0,218	1	0,382	0,674	0,378	0,389	0,040
	Sig. (2-tailed)	0,569	0,173	0,584	0,085	0,019	0,462	0,392	0,214	0,807	0,770	0,311	0,502	0,331	0,390	0,496		0,220	0,016	0,226	0,212	0,903
	N	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
IGF1_D0_D2	Pearson Correlation	-0,503	-0,135	0,286	0,963	0,706	0,498	0,860	0,443	0,651	0,667	-0,134	0,254	0,965	0,066	0,209	0,382	1	0,940	0,948	0,856	-0,132
	Sig. (2-tailed)	0,095	0,676	0,368	0,000	0,010	0,100	0,000	0,149	0,022	0,018	0,679	0,426	0,000	0,839	0,515	0,220		0,000	0,000	0,000	0,682
	N	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
IGF1_D0_D3	Pearson Correlation	-0,470	-0,263	0,293	0,961	0,809	0,311	0,788	0,497	0,549	0,568	-0,224	0,124	0,885	-0,048	0,087	0,674	0,940	1	0,897	0,828	-0,091
	Sig. (2-tailed)	0,123	0,409	0,355	0,000	0,001	0,325	0,002														

		Correlations																					
		P4 D0	P4 D2	P4 D3	IGF1 D0	IGF1 D2	IGF1 D3	T3 D0	T3 D2	T3 D3	T4 D0	T4 D2	T4 D3	INS D0	INS D2	INS D3	IGF1_D2_D3	IGF1_D0_D2	IGF1_D0_D3	INS_D0_D2	INS_D0_D3	INS_D2_D3	
BHB_d0	Pearson Correlation	0,115	0,503	0,699	0,052	0,177	0,171	-0,142	0,473	0,260	-0,290	-0,065	-0,418	-0,045	-0,244	0,508	0,054	-0,022	0,003	0,018	-0,250	-0,518	
	Sig. (2-tailed)	0,722	0,096	0,011	0,872	0,581	0,596	0,660	0,121	0,414	0,360	0,842	0,176	0,890	0,444	0,091	0,867	0,947	0,993	0,956	0,433	0,085	
	N	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
BHB_d2	Pearson Correlation	0,448	-0,263	-0,145	-0,083	-0,117	-0,053	-0,097	-0,259	0,231	-0,164	0,131	-0,081	0,069	0,355	-0,355	-0,091	-0,056	-0,078	-0,022	0,211	0,451	
	Sig. (2-tailed)	0,144	0,409	0,653	0,797	0,716	0,870	0,764	0,417	0,470	0,610	0,685	0,801	0,832	0,257	0,257	0,779	0,864	0,810	0,945	0,510	0,141	
	N	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	
BHB_d3	Pearson Correlation	-0,134	0,146	0,469	0,114	0,084	-0,317	-0,192	0,160	-0,056	-0,415	-0,048	-0,381	0,055	-0,458	-0,067	0,388	0,118	0,237	0,173	0,081	-0,168	
	Sig. (2-tailed)	0,679	0,651	0,124	0,724	0,795	0,315	0,550	0,618	0,863	0,180	0,881	0,221	0,865	0,134	0,836	0,212	0,715	0,457	0,592	0,802	0,601	
	N	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	
cholest_d0	Pearson Correlation	-0,442	-0,044	0,407	0,680	0,612	0,127	0,442	0,310	0,474	0,562	-0,463	-0,109	0,557	-0,243	0,210	0,609	0,644	0,740	0,620	0,458	-0,282	
	Sig. (2-tailed)	0,150	0,892	0,189	0,015	0,034	0,695	0,151	0,327	0,119	0,057	0,129	0,737	0,060	0,447	0,513	0,036	0,024	0,006	0,032	0,134	0,374	
	N	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	
cholest_d2	Pearson Correlation	-0,442	-0,241	0,325	0,623	0,597	-0,045	0,414	0,350	0,354	0,404	-0,329	-0,151	0,495	-0,193	0,018	0,748	0,570	0,731	0,545	0,476	-0,107	
	Sig. (2-tailed)	0,150	0,451	0,303	0,030	0,040	0,890	0,181	0,265	0,258	0,193	0,297	0,639	0,102	0,549	0,955	0,005	0,053	0,007	0,067	0,118	0,740	
	N	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	
cholest_d3	Pearson Correlation	-0,409	0,056	0,508	0,631	0,534	0,081	0,391	0,295	0,394	0,433	-0,253	-0,065	0,530	-0,160	0,257	0,558	0,616	0,698	0,571	0,412	-0,279	
	Sig. (2-tailed)	0,187	0,863	0,092	0,028	0,074	0,803	0,209	0,352	0,205	0,160	0,428	0,840	0,076	0,620	0,420	0,059	0,033	0,012	0,053	0,183	0,379	
	N	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	
GOT_d0	Pearson Correlation	0,110	0,109	-0,228	0,129	-0,079	0,238	-0,024	-0,346	0,222	0,150	-0,026	-0,006	0,204	0,533	-0,026	-0,310	0,229	0,069	0,068	0,210	0,277	
	Sig. (2-tailed)	0,733	0,735	0,477	0,689	0,807	0,457	0,942	0,271	0,488	0,642	0,936	0,986	0,524	0,074	0,937	0,326	0,474	0,831	0,834	0,513	0,383	
	N	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	
GOT_d2	Pearson Correlation	0,380	-0,304	-0,726	-0,473	-0,477	-0,354	-0,399	-0,767	-0,351	-0,303	0,041	0,097	-0,340	0,458	-0,609	-0,242	-0,420	-0,425	-0,457	-0,084	0,700	
	Sig. (2-tailed)	0,224	0,336	0,008	0,120	0,117	0,258	0,199	0,004	0,263	0,338	0,900	0,764	0,280	0,134	0,036	0,449	0,174	0,169	0,135	0,795	0,011	
	N	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	
GOT_d3	Pearson Correlation	0,453	0,411	-0,143	-0,571	-0,674	-0,268	-0,478	-0,716	-0,439	-0,273	0,016	0,044	-0,422	0,250	0,091	-0,554	-0,453	-0,566	-0,487	-0,449	0,049	
	Sig. (2-tailed)	0,139	0,184	0,658	0,053	0,016	0,401	0,116	0,009	0,154	0,390	0,959	0,892	0,171	0,433	0,778	0,062	0,139	0,055	0,109	0,143	0,880	
	N	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	
karbamid_d0	Pearson Correlation	0,525	0,172	-0,478	-0,725	-0,586	-0,015	-0,669	-0,604	-0,296	-0,316	0,286	0,121	-0,670	0,339	-0,179	-0,679	-0,724	-0,829	-0,757	-0,581	0,304	
	Sig. (2-tailed)	0,080	0,594	0,116	0,008	0,045	0,963	0,017	0,037	0,350	0,318	0,368	0,708	0,017	0,282	0,578	0,015	0,008	0,001	0,004	0,048	0,337	
	N	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	
karbamid_d2	Pearson Correlation	0,225	0,081	-0,235	-0,563	-0,727	-0,288	-0,393	-0,340	-0,552	-0,025	0,295	-0,164	-0,471	-0,105	-0,078	-0,598	-0,414	-0,551	-0,444	-0,428	0,010	
	Sig. (2-tailed)	0,482	0,804	0,462	0,056	0,007	0,364	0,206	0,280	0,063	0,939	0,352	0,611	0,122	0,745	0,810	0,040	0,181	0,063	0,148	0,165	0,974	
	N	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	
karbamid_d3	Pearson Correlation	0,513	-0,141	-0,556	-0,593	-0,641	-0,268	-0,462	-0,641	-0,554	-0,138	0,618	0,203	-0,493	0,459	-0,389	-0,515	-0,502	-0,591	-0,611	-0,323	0,527	
	Sig. (2-tailed)	0,088	0,661	0,060	0,042	0,025	0,400	0,131	0,025	0,062	0,669	0,032	0,526	0,104	0,133	0,212	0,087	0,096	0,043	0,035	0,306	0,078	
	N	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	
osszfeh_d0	Pearson Correlation	0,061	-0,369	0,251	0,335	0,204	-0,409	0,378	-0,096	-0,030	0,401	-0,309	0,089	0,399	-0,465	-0,184	0,614	0,371	0,523	0,518	0,464	-0,079	
	Sig. (2-tailed)	0,851	0,238	0,431	0,287	0,525	0,187	0,225	0,766	0,927	0,197	0,328	0,783	0,199	0,128	0,566	0,034	0,235	0,081	0,084	0,128	0,806	
	N	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	
osszfeh_d2	Pearson Correlation	-0,020	-0,507	0,215	0,408	0,324	-0,413	0,459	0,108	0,000	0,333	-0,246	-0,025	0,428	-0,293	-0,217	0,759	0,409	0,607	0,504	0,506	0,029	
	Sig. (2-tailed)	0,951	0,093	0,502	0,188	0,305	0,182	0,133	0,739	0,999	0,290	0,442	0,939	0,165	0,355	0,499	0,004	0,186	0,036	0,095	0,093	0,929	
	N	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	
osszfeh_d3	Pearson Correlation	0,197	-0,291	0,296	0,336	0,135	-0,369	0,433	-0,111	-0,086	0,264	-0,030	0,212	0,465	-0,199	-0,123	0,495	0,410	0,510	0,517	0,504	0,001	
	Sig. (2-tailed)	0,539	0,359	0,350	0,285	0,676	0,238	0,160	0,731	0,791	0,406	0,925	0,509	0,127	0,535	0,703	0,101	0,186	0,090	0,086	0,095	0,999	
	N	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	
NEFA_d0	Pearson Correlation	-0,103	-0,305	-0,152	0,343	0,370	0,042	0,071	0,507	0,095	-0,224	-0,128	-0,646	0,170	0,184	-0,220	0,399	0,292	0,380	0,123	0,255	0,262	
	Sig. (2-tailed)	0,750	0,335	0,638	0,275	0,237	0,896	0,827	0,092	0,769	0,483	0,691	0,023	0,598	0,566	0,492	0,198	0,358	0,223	0,704	0,424	0,411	
	N	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	
NEFA_d2	Pearson Correlation	-0,429	-0,260	0,278	0,939	0,847	0,398	0,740	0,649	0,601	0,441	-0,217	-0,011	0,832	-0,038	0,091	0,640	0,888	0,946	0,842	0,774	-0,090	
	Sig. (2-tailed)	0,164	0,415	0,381	0,000	0,001	0,200	0,006	0,022	0,039	0,151	0,498	0,973	0,001	0,907	0,778	0,025	0,000	0,000	0,001	0,003	0,781	
	N	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	
NEFA_d3	Pearson Correlation	-0,029	-0,015	0,545	0,412	0,530	-0,063	0,037	0,608	0,122	-0,166	0,098	-0,433	0,184	-0,239	0,070	0,684	0,303	0,494	0,245	0,151	-0,170	
	Sig. (2-tailed)	0,928	0,963	0,067	0,183	0,076	0,847	0,909	0,036	0,706	0,606	0,761	0,159	0,567	0,453	0,830	0,014	0,338	0,102	0,442	0,639	0,596	
	N	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	
CL	Pearson Correlation	-0,075	0,431	0,787	0,525	0,371	0,131	0,257	0,485	0,152	0,336	-0,167	-0,352	0,381	-0,340	0,624	0,320	0,553	0,560	0,468	0,118	-0,654	
	Sig. (2-tailed)	0,816	0,162	0,002	0,080	0,236	0,685	0,420	0,110	0,637	0,286	0,604	0,261	0,222	0,280	0,030	0,311	0,062	0,058	0,125	0,715	0,021	
	N	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	
embrio1	Pearson Correlation	-0,133	0,260	0,709	0,615	0,539	0,169																

		Correlations																				
		BHB_d0	BHB_d2	BHB_d3	_d0	_d2	_d3	GOT_d0	GOT_d2	GOT_d3	_d0	_d2	_d3	0	2	3	NEFA_d0	NEFA_d2	NEFA_d3	CL	embriol	embriol2
P4_D0	Pearson Correlation	0,115	0,448	-0,134	-0,442	-0,442	-0,409	0,110	0,380	0,453	0,525	0,225	0,513	0,061	-0,020	0,197	-0,103	-0,429	-0,029	-0,075	-0,133	-0,246
	Sig. (2-tailed)	0,722	0,144	0,679	0,150	0,150	0,187	0,733	0,224	0,139	0,080	0,482	0,088	0,851	0,951	0,539	0,750	0,164	0,928	0,816	0,681	0,557
	N	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
P4_D2	Pearson Correlation	0,503	-0,263	0,146	-0,044	-0,241	0,056	0,109	-0,304	0,411	0,172	0,081	-0,141	-0,369	-0,507	-0,291	-0,305	-0,260	-0,015	0,431	0,260	-0,415
	Sig. (2-tailed)	0,096	0,409	0,651	0,892	0,451	0,863	0,735	0,336	0,184	0,594	0,804	0,661	0,238	0,093	0,359	0,335	0,415	0,963	0,162	0,414	0,307
	N	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
P4_D3	Pearson Correlation	0,699	-0,145	0,469	0,407	0,325	0,508	-0,228	-0,726	-0,143	-0,478	-0,235	-0,556	0,251	0,215	0,296	-0,152	0,278	0,545	0,787	0,709	0,070
	Sig. (2-tailed)	0,011	0,653	0,124	0,189	0,303	0,092	0,477	0,008	0,658	0,116	0,462	0,060	0,431	0,502	0,350	0,638	0,381	0,067	0,002	0,010	0,868
	N	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
IGF1_D0	Pearson Correlation	0,052	-0,083	0,114	0,680	0,623	0,631	0,129	-0,473	-0,571	-0,725	-0,563	-0,593	0,335	0,408	0,336	0,343	0,939	0,412	0,525	0,615	0,393
	Sig. (2-tailed)	0,872	0,797	0,724	0,015	0,030	0,028	0,689	0,120	0,053	0,008	0,056	0,042	0,287	0,188	0,285	0,275	0,000	0,183	0,080	0,033	0,336
	N	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
IGF1_D2	Pearson Correlation	0,177	-0,117	0,084	0,612	0,597	0,534	-0,079	-0,477	-0,674	-0,586	-0,727	-0,641	0,204	0,324	0,135	0,370	0,847	0,530	0,371	0,539	0,602
	Sig. (2-tailed)	0,581	0,716	0,795	0,034	0,040	0,074	0,807	0,117	0,016	0,045	0,007	0,025	0,525	0,305	0,676	0,237	0,001	0,076	0,236	0,071	0,114
	N	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
IGF1_D3	Pearson Correlation	0,171	-0,053	-0,317	0,127	-0,045	0,081	0,238	-0,354	-0,268	-0,015	-0,288	-0,268	-0,409	-0,413	-0,369	0,042	0,398	-0,063	0,131	0,169	-0,245
	Sig. (2-tailed)	0,596	0,870	0,315	0,695	0,890	0,803	0,457	0,258	0,401	0,963	0,364	0,400	0,187	0,182	0,238	0,896	0,200	0,847	0,685	0,599	0,558
	N	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
T3_D0	Pearson Correlation	-0,142	-0,097	-0,192	0,442	0,414	0,391	-0,024	-0,399	-0,478	-0,669	-0,393	-0,462	0,378	0,459	0,433	0,071	0,740	0,037	0,257	0,330	0,089
	Sig. (2-tailed)	0,660	0,764	0,550	0,151	0,181	0,209	0,942	0,199	0,116	0,017	0,206	0,131	0,225	0,133	0,160	0,827	0,006	0,909	0,420	0,295	0,833
	N	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
T3_D2	Pearson Correlation	0,473	-0,259	0,160	0,310	0,350	0,295	-0,346	-0,767	-0,716	-0,604	-0,340	-0,641	-0,096	0,108	-0,111	0,507	0,649	0,608	0,485	0,611	0,574
	Sig. (2-tailed)	0,121	0,417	0,618	0,327	0,265	0,352	0,271	0,004	0,009	0,037	0,280	0,025	0,766	0,739	0,731	0,092	0,022	0,036	0,110	0,035	0,136
	N	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
T3_D3	Pearson Correlation	0,260	0,231	-0,056	0,474	0,354	0,394	0,222	-0,351	-0,439	-0,296	-0,552	-0,554	-0,030	0,000	-0,086	0,095	0,601	0,122	0,152	0,243	0,126
	Sig. (2-tailed)	0,414	0,470	0,863	0,119	0,258	0,205	0,488	0,263	0,154	0,350	0,063	0,062	0,927	0,999	0,791	0,769	0,039	0,706	0,637	0,446	0,766
	N	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
T4_D0	Pearson Correlation	-0,290	-0,164	-0,415	0,562	0,404	0,433	0,150	-0,303	-0,273	-0,316	-0,025	-0,138	0,401	0,333	0,264	-0,224	0,441	-0,166	0,336	0,396	-0,200
	Sig. (2-tailed)	0,360	0,610	0,180	0,057	0,193	0,160	0,642	0,338	0,390	0,318	0,939	0,669	0,197	0,290	0,406	0,483	0,151	0,606	0,286	0,202	0,635
	N	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
T4_D2	Pearson Correlation	-0,065	0,131	-0,048	-0,463	-0,329	-0,253	-0,026	0,041	0,016	0,286	0,295	0,618	-0,309	-0,246	-0,030	-0,128	-0,217	0,098	-0,167	-0,182	-0,631
	Sig. (2-tailed)	0,842	0,685	0,881	0,129	0,297	0,428	0,936	0,900	0,959	0,368	0,352	0,032	0,328	0,442	0,925	0,691	0,498	0,761	0,604	0,571	0,094
	N	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
T4_D3	Pearson Correlation	-0,418	-0,081	-0,381	-0,109	-0,151	-0,065	-0,006	0,097	0,044	0,121	-0,164	0,203	0,089	-0,025	0,212	-0,646	-0,011	-0,433	-0,352	-0,386	-0,603
	Sig. (2-tailed)	0,176	0,801	0,221	0,737	0,639	0,840	0,986	0,764	0,892	0,708	0,611	0,526	0,783	0,939	0,509	0,023	0,973	0,159	0,261	0,215	0,113
	N	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
INS_D0	Pearson Correlation	-0,045	0,069	0,055	0,557	0,495	0,530	0,204	-0,340	-0,422	-0,670	-0,471	-0,493	0,399	0,428	0,465	0,170	0,832	0,184	0,381	0,414	0,099
	Sig. (2-tailed)	0,890	0,832	0,865	0,060	0,102	0,076	0,524	0,280	0,171	0,017	0,122	0,104	0,199	0,165	0,127	0,598	0,001	0,567	0,222	0,181	0,816
	N	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
INS_D2	Pearson Correlation	-0,244	0,355	-0,458	-0,243	-0,193	-0,160	0,533	0,458	0,250	0,339	-0,105	0,459	-0,465	-0,293	-0,199	0,184	-0,038	-0,239	-0,340	-0,243	-0,290
	Sig. (2-tailed)	0,444	0,257	0,134	0,447	0,549	0,620	0,074	0,134	0,433	0,282	0,745	0,133	0,128	0,355	0,535	0,566	0,907	0,453	0,280	0,446	0,486
	N	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
INS_D3	Pearson Correlation	0,508	-0,355	-0,067	0,210	0,018	0,257	-0,026	-0,609	0,091	-0,179	-0,078	-0,389	-0,184	-0,217	-0,123	-0,220	0,091	0,070	0,624	0,551	-0,213
	Sig. (2-tailed)	0,091	0,257	0,836	0,513	0,955	0,420	0,937	0,036	0,778	0,578	0,810	0,212	0,566	0,499	0,703	0,492	0,778	0,830	0,030	0,063	0,613
	N	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
IGF1_D2_D3	Pearson Correlation	0,054	-0,091	0,388	0,609	0,748	0,558	-0,310	-0,242	-0,554	-0,679	-0,598	-0,515	0,614	0,759	0,495	0,399	0,640	0,684	0,320	0,484	0,965
	Sig. (2-tailed)	0,867	0,779	0,212	0,036	0,005	0,059	0,326	0,449	0,062	0,015	0,040	0,087	0,034	0,004	0,101	0,198	0,025	0,014	0,311	0,111	0,000
	N	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
IGF1_D0_D2	Pearson Correlation	-0,022	-0,056	0,118	0,644	0,570	0,616	0,229	-0,420	-0,453	-0,724	-0,414	-0,502	0,371	0,409	0,410	0,292	0,888	0,303	0,553	0,591	0,206
	Sig. (2-tailed)	0,947	0,864	0,715	0,024	0,053	0,033	0,474	0,174	0,139	0,008	0,181	0,096	0,235	0,186	0,186	0,358	0,000	0,338	0,062	0,043	0,625
	N	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
IGF1_D0_D3	Pearson Correlation	0,003	-0,078	0,237	0,740	0,731	0,698	0,069	-0,425	-0,566	-0,829	-0,551	-0,591	0,523	0,607	0,510	0,380	0,946	0,494			

Correlations																						
		BHB_d0	BHB_d2	BHB_d3	_d0	_d2	_d3	GOT_d0	GOT_d2	GOT_d3	_d0	_d2	_d3	0	2	3	NEFA_d0	NEFA_d2	NEFA_d3	CL	embrio1	embrio2
BHB_d0	Pearson Correlation	1	0,278	0,529	0,065	0,054	0,146	-0,301	-0,625	-0,271	-0,231	-0,315	-0,581	-0,047	-0,017	0,011	0,093	0,175	0,637	0,446	0,411	0,200
	Sig. (2-tailed)		0,382	0,077	0,840	0,867	0,651	0,342	0,030	0,394	0,471	0,319	0,047	0,885	0,957	0,973	0,774	0,587	0,026	0,146	0,184	0,636
	N	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
BHB_d2	Pearson Correlation	0,278	1	0,157	-0,173	-0,146	-0,199	0,213	0,261	-0,069	0,240	-0,113	0,110	0,214	0,149	0,267	0,085	0,038	0,146	-0,237	-0,240	-0,100
	Sig. (2-tailed)	0,382		0,627	0,591	0,651	0,536	0,506	0,412	0,832	0,452	0,725	0,734	0,504	0,644	0,401	0,794	0,908	0,651	0,459	0,453	0,813
	N	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
BHB_d3	Pearson Correlation	0,529	0,157	1	0,303	0,396	0,445	-0,109	-0,249	-0,146	-0,455	-0,302	-0,464	0,253	0,257	0,283	0,217	0,240	0,701	0,387	0,304	0,482
	Sig. (2-tailed)	0,077	0,627		0,338	0,203	0,147	0,736	0,434	0,651	0,137	0,341	0,129	0,427	0,420	0,372	0,498	0,453	0,011	0,214	0,337	0,226
	N	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
cholest_d0	Pearson Correlation	0,065	-0,173	0,303	1	0,933	0,920	0,141	-0,373	-0,377	-0,649	-0,393	-0,582	0,443	0,486	0,198	0,165	0,610	0,403	0,582	0,690	0,723
	Sig. (2-tailed)	0,840	0,591	0,338		0,000	0,000	0,661	0,232	0,228	0,022	0,206	0,047	0,149	0,109	0,537	0,609	0,035	0,194	0,047	0,013	0,043
	N	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
cholest_d2	Pearson Correlation	0,054	-0,146	0,396	0,933	1	0,934	-0,043	-0,352	-0,453	-0,731	-0,489	-0,531	0,481	0,627	0,317	0,160	0,586	0,541	0,457	0,611	0,781
	Sig. (2-tailed)	0,867	0,651	0,203	0,000		0,000	0,893	0,262	0,139	0,007	0,107	0,076	0,114	0,029	0,315	0,619	0,045	0,069	0,135	0,035	0,022
	N	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
cholest_d3	Pearson Correlation	0,146	-0,199	0,445	0,920	0,934	1	0,111	-0,385	-0,253	-0,688	-0,481	-0,509	0,326	0,444	0,260	0,046	0,522	0,497	0,578	0,667	0,581
	Sig. (2-tailed)	0,651	0,536	0,147	0,000	0,000		0,732	0,217	0,427	0,013	0,113	0,091	0,301	0,148	0,415	0,886	0,082	0,100	0,049	0,018	0,131
	N	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
GOT_d0	Pearson Correlation	-0,301	0,213	-0,109	0,141	-0,043	0,111	1	0,542	0,539	0,311	0,137	0,309	-0,291	-0,387	-0,255	0,272	0,006	-0,328	0,083	0,011	-0,461
	Sig. (2-tailed)	0,342	0,506	0,736	0,661	0,893	0,732		0,069	0,071	0,325	0,672	0,328	0,359	0,214	0,423	0,393	0,986	0,297	0,797	0,972	0,250
	N	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
GOT_d2	Pearson Correlation	-0,625	0,261	-0,249	-0,373	-0,352	-0,385	0,542	1	0,670	0,647	0,204	0,695	-0,189	-0,254	-0,139	-0,015	-0,507	-0,560	-0,639	-0,672	-0,235
	Sig. (2-tailed)	0,030	0,412	0,434	0,232	0,262	0,217	0,069		0,017	0,023	0,526	0,012	0,557	0,426	0,666	0,962	0,092	0,058	0,025	0,017	0,576
	N	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
GOT_d3	Pearson Correlation	-0,271	-0,069	-0,146	-0,377	-0,453	-0,253	0,539	0,670	1	0,580	0,317	0,562	-0,418	-0,508	-0,234	-0,263	-0,687	-0,573	-0,214	-0,376	-0,669
	Sig. (2-tailed)	0,394	0,832	0,651	0,228	0,139	0,427	0,071	0,017		0,048	0,315	0,057	0,176	0,092	0,464	0,409	0,013	0,051	0,504	0,229	0,070
	N	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
karbamid_d0	Pearson Correlation	-0,231	0,240	-0,455	-0,649	-0,731	-0,688	0,311	0,647	0,580	1	0,465	0,739	-0,547	-0,696	-0,563	-0,286	-0,783	-0,614	-0,624	-0,684	-0,726
	Sig. (2-tailed)	0,471	0,452	0,137	0,022	0,007	0,013	0,325	0,023	0,048		0,127	0,006	0,065	0,012	0,057	0,367	0,003	0,034	0,030	0,014	0,041
	N	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
karbamid_d2	Pearson Correlation	-0,315	-0,113	-0,302	-0,393	-0,489	-0,481	0,137	0,204	0,317	0,465	1	0,593	-0,178	-0,336	-0,309	-0,068	-0,533	-0,492	-0,072	-0,191	-0,525
	Sig. (2-tailed)	0,319	0,725	0,341	0,206	0,107	0,113	0,672	0,526	0,315	0,127		0,042	0,579	0,285	0,328	0,835	0,074	0,104	0,824	0,552	0,182
	N	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
karbamid_d3	Pearson Correlation	-0,581	0,110	-0,464	-0,582	-0,531	-0,509	0,309	0,695	0,562	0,739	0,593	1	-0,329	-0,364	-0,197	-0,243	-0,667	-0,540	-0,532	-0,564	-0,605
	Sig. (2-tailed)	0,047	0,734	0,129	0,047	0,076	0,091	0,328	0,012	0,057	0,006	0,042		0,296	0,245	0,540	0,448	0,018	0,070	0,075	0,056	0,112
	N	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
osszfeh_d0	Pearson Correlation	-0,047	0,214	0,253	0,443	0,481	0,326	-0,291	-0,189	-0,418	-0,547	-0,178	-0,329	1	0,921	0,846	-0,010	0,458	0,317	0,267	0,291	0,492
	Sig. (2-tailed)	0,885	0,504	0,427	0,149	0,114	0,301	0,359	0,557	0,176	0,065	0,579	0,296		0,000	0,001	0,974	0,134	0,316	0,402	0,359	0,215
	N	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
osszfeh_d2	Pearson Correlation	-0,017	0,149	0,257	0,486	0,627	0,444	-0,387	-0,254	-0,508	-0,696	-0,336	-0,364	0,921	1	0,856	0,086	0,533	0,468	0,265	0,368	0,675
	Sig. (2-tailed)	0,957	0,644	0,420	0,109	0,029	0,148	0,214	0,426	0,092	0,012	0,285	0,245	0,000		0,000	0,791	0,075	0,125	0,404	0,239	0,066
	N	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
osszfeh_d3	Pearson Correlation	0,011	0,267	0,283	0,198	0,317	0,260	-0,255	-0,139	-0,234	-0,563	-0,309	-0,197	0,846	0,856	1	-0,056	0,430	0,360	0,240	0,225	0,207
	Sig. (2-tailed)	0,973	0,401	0,372	0,537	0,315	0,415	0,423	0,666	0,464	0,057	0,328	0,540	0,001	0,000		0,862	0,163	0,250	0,453	0,483	0,623
	N	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
NEFA_d0	Pearson Correlation	0,093	0,085	0,217	0,165	0,160	0,046	0,272	-0,015	-0,263	-0,286	-0,068	-0,243	-0,010	0,086	-0,056	1	0,544	0,426	0,374	0,429	0,606
	Sig. (2-tailed)	0,774	0,794	0,498	0,609	0,619	0,886	0,393	0,962	0,409	0,367	0,835	0,448	0,974	0,791	0,862		0,067	0,167	0,231	0,164	0,111
	N	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
NEFA_d2	Pearson Correlation	0,175	0,038	0,240	0,610	0,586	0,522	0,006	-0,507	-0,687	-0,783	-0,533	-0,667	0,458	0,533	0,430	0,544	1	0,574	0,568	0,658	0,592
	Sig. (2-tailed)	0,587	0,908	0,453	0,035	0,045	0,082	0,986	0,092	0,013	0,003	0,074	0,018	0,134	0,075	0,163	0,067		0,051	0,054	0,020	0,122
	N	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
NEFA_d3	Pearson Correlation	0,637	0,146	0,701	0,403	0,541	0,497	-0,328	-0,560	-0,573	-0,614	-0,492	-0,540	0,317	0,468	0,360	0,426	0,574	1	0,559	0,641	0,776
	Sig. (2-tailed)	0,026	0,651	0,011	0,194	0,069	0,100	0,297	0,058	0,051	0,034	0,104	0,070									

17. 11. melléklet: T- teszt szezon és szezonon kívüli időszak (2009. és 2010. összevonva, donorok)

Independent Samples Test										
		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence	
									Lower	Upper
P4_D0	Equal variances assumed	0,870	0,364	0,535	17	0,599	0,38513	0,71943	-1,133	1,903
	Equal variances not assumed			0,724	16,627	0,479	0,38513	0,53217	-0,740	1,510
P4_D2	Equal variances assumed	1,604	0,222	-0,565	17	0,579	-1,45577	2,57511	-6,889	3,977
	Equal variances not assumed			-0,448	6,268	0,669	-1,45577	3,24989	-9,326	6,415
P4_D3	Equal variances assumed	0,043	0,838	-0,891	17	0,386	-9,48038	10,64545	-31,940	12,980
	Equal variances not assumed			-0,908	10,279	0,385	-9,48038	10,44344	-32,665	13,704
IGF1_D0	Equal variances assumed	4,031	0,061	-2,611	17	0,018	-125,44077	48,03890	-226,794	-24,088
	Equal variances not assumed			-2,147	6,632	0,071	-125,44077	58,43909	-265,196	14,315
IGF1_D2	Equal variances assumed	0,021	0,887	-0,799	17	0,435	-20,95000	26,21726	-76,264	34,364
	Equal variances not assumed			-0,745	8,384	0,476	-20,95000	28,10227	-85,241	43,341
IGF1_D3	Equal variances assumed	0,304	0,588	-0,216	17	0,832	-5,44321	25,23099	-58,676	47,790
	Equal variances not assumed			-0,209	9,109	0,839	-5,44321	26,04347	-64,251	53,364
T3_D0	Equal variances assumed	0,441	0,516	-2,426	17	0,027	-0,59923	0,24700	-1,120	-0,078
	Equal variances not assumed			-2,123	7,385	0,069	-0,59923	0,28229	-1,260	0,061
T3_D2	Equal variances assumed	0,184	0,673	-1,231	17	0,235	-0,29795	0,24212	-0,809	0,213
	Equal variances not assumed			-1,174	8,795	0,271	-0,29795	0,25385	-0,874	0,278
T3_D3	Equal variances assumed	0,944	0,345	-1,814	17	0,087	-0,37410	0,20623	-0,809	0,061
	Equal variances not assumed			-1,547	7,054	0,165	-0,37410	0,24179	-0,945	0,197
T4_D0	Equal variances assumed	0,649	0,431	-1,162	17	0,261	-14,55231	12,52606	-40,980	11,875
	Equal variances not assumed			-1,371	14,864	0,191	-14,55231	10,61521	-37,196	8,092
T4_D2	Equal variances assumed	5,449	0,032	-0,383	17	0,707	-3,59013	9,38046	-23,381	16,201
	Equal variances not assumed			-0,502	16,993	0,622	-3,59013	7,14980	-18,675	11,495
T4_D3	Equal variances assumed	0,869	0,364	-0,586	17	0,565	-6,52628	11,13150	-30,012	16,959
	Equal variances not assumed			-0,619	11,214	0,549	-6,52628	10,54961	-29,692	16,639
INS_D0	Equal variances assumed	1,168	0,295	0,166	17	0,870	0,71615	4,32360	-8,406	9,838
	Equal variances not assumed			0,199	15,454	0,845	0,71615	3,59790	-6,933	8,365
INS_D2	Equal variances assumed	1,762	0,202	1,431	17	0,171	1,74603	1,22005	-0,828	4,320
	Equal variances not assumed			1,901	16,907	0,074	1,74603	0,91828	-0,192	3,684
INS_D3	Equal variances assumed	1,359	0,260	-1,009	17	0,327	-1,08064	1,07097	-3,340	1,179
	Equal variances not assumed			-0,798	6,250	0,454	-1,08064	1,35419	-4,362	2,201

17. 12. melléklet: T- teszt szezon és szezonon kívüli időszak (2009. és 2010. összevonva, recipiensek)

Independent Samples Test										
		Levene's Test for		t-test for Equality of Means						
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence	
									Lower	Upper
P4_D0	Equal variances assumed	0,017	0,897	-1,941	33	0,061	-0,36378	0,18743	-0,745	0,018
	Equal variances not assumed			-1,971	26,537	0,059	-0,36378	0,18457	-0,743	0,015
P4_D2	Equal variances assumed	1,794	0,189	3,223	34	0,003	1,14211	0,35440	0,422	1,862
	Equal variances not assumed			4,102	28,311	0,000	1,14211	0,27845	0,572	1,712
P4_D3	Equal variances assumed	2,188	0,148	2,474	34	0,019	3,46866	1,40207	0,619	6,318
	Equal variances not assumed			3,057	31,342	0,005	3,46866	1,13466	1,156	5,782
IGF1_D0	Equal variances assumed	0,052	0,820	2,134	33	0,040	39,63664	18,57790	1,840	77,434
	Equal variances not assumed			2,070	23,009	0,050	39,63664	19,15218	0,018	79,255
IGF1_D2	Equal variances assumed	1,995	0,167	-0,900	34	0,374	-20,92013	23,24074	-68,151	26,311
	Equal variances not assumed			-0,750	15,181	0,464	-20,92013	27,87853	-80,280	38,440
IGF1_D3	Equal variances assumed	0,652	0,425	0,456	34	0,651	6,79291	14,89316	-23,474	37,059
	Equal variances not assumed			0,484	29,552	0,632	6,79291	14,04387	-21,907	35,493
T3_D0	Equal variances assumed	0,091	0,765	-0,875	33	0,388	-0,18080	0,20674	-0,601	0,240
	Equal variances not assumed			-0,944	31,088	0,352	-0,18080	0,19152	-0,571	0,210
T3_D2	Equal variances assumed	1,081	0,306	-0,411	34	0,684	-0,09341	0,22734	-0,555	0,369
	Equal variances not assumed			-0,392	21,828	0,699	-0,09341	0,23804	-0,587	0,400
T3_D3	Equal variances assumed	0,210	0,649	-2,829	34	0,008	-0,38167	0,13489	-0,656	-0,108
	Equal variances not assumed			-2,767	23,431	0,011	-0,38167	0,13792	-0,667	-0,097
T4_D0	Equal variances assumed	1,107	0,300	0,762	33	0,452	5,57979	7,32387	-9,321	20,480
	Equal variances not assumed			0,821	30,995	0,418	5,57979	6,79481	-8,278	19,438
T4_D2	Equal variances assumed	0,003	0,958	0,449	34	0,656	3,86619	8,61068	-13,633	21,365
	Equal variances not assumed			0,472	28,909	0,640	3,86619	8,18819	-12,883	20,615
T4_D3	Equal variances assumed	2,193	0,148	0,198	34	0,844	2,91923	14,73835	-27,033	32,871
	Equal variances not assumed			0,249	29,712	0,805	2,91923	11,72738	-21,041	26,879
INS_D0	Equal variances assumed	2,497	0,124	2,464	33	0,019	5,73381	2,32689	1,000	10,468
	Equal variances not assumed			2,726	32,363	0,010	5,73381	2,10317	1,452	10,016
INS_D2	Equal variances assumed	0,009	0,927	0,554	34	0,583	0,71067	1,28331	-1,897	3,319
	Equal variances not assumed			0,567	26,785	0,576	0,71067	1,25418	-1,864	3,285
INS_D3	Equal variances assumed	2,953	0,095	1,099	34	0,279	0,50227	0,45690	-0,426	1,431
	Equal variances not assumed			1,286	33,981	0,207	0,50227	0,39059	-0,292	1,296