

DOKTORI (Ph.D.) ÉRTEKEZÉS

BUDAI CSILLA

DEBRECEN

2014

DEBRECENI EGYETEM
Mezőgazdaság-, Élelmiszertudományi és Környezetgazdálkodási Kar
ÁLLATTENYÉSZTÉSI TUDOMÁNYOK DOKTORI ISKOLA

Doktori Iskola vezető:

DR. KOVÁCS ANDRÁS
egyetemi tanár, az MTA doktora

TÉMAVEZETŐK:

Dr. Kovács András D.Sc.
Dr. Rátky József D.Sc.

DOKTORI (PH.D.) ÉRTEKEZÉS

ZSELATINOK, ANTIOXIDÁNSOK ÉS EGYES KÖRNYEZETI
TÉNYEZŐK HATÁSA KOSOK ANDROLÓGIAI
PARAMÉTEREIRE

Készítette:

BUDAI CSILLA
doktorjelölt

Debrecen

2014

ZSELATINOK, ANTIOXIDÁNSOK ÉS EGYES KÖRNYEZETI TÉNYEZŐK HATÁSA KOSOK ANDROLÓGIAI PARAMÉTEREIRE

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

Írta: **BUDAI CSILLA** okleveles agrármérnök

Készült a Debreceni Egyetem Állattenyésztési Tudományok Doktori Iskola
Szaporodásbiológia, genomika programja keretében

Témavezetők: Dr. Kovács András D.Sc.
Dr. Rátky József D.Sc.

A doktori szigorlati bizottság:

Elnök: Dr. Komlói István D.Sc.
Tagok: Novottniné Dr. Dankó Gabriella Ph.D.
Dr. Nagy Szabolcs Ph.D.

A doktori szigorlat időpontja: 2014. január 20.

A doktori bíráló bizottság tagjai:

	<i>Név</i>	<i>Tud. fok.</i>	<i>Aláírás</i>
Elnök:
Tagok:

Titkár:
Opponensek:

Az értekezés védésének időpontja: 2014.

Tartalomjegyzék

1	BEVEZETÉS	6
2	IRODALMI ÁTTEKINTÉS	10
2.1	A spermium morfológiája	10
2.2	Az ondóplazma összetétele	12
2.3	Ondóplazma fehérjék	12
2.4	Az ondósejtek életjelenségei	15
2.4.1	Motilitás	15
2.4.2	Kapacitáció	16
2.4.3	Akroszóma reakció	19
2.4.4	Apoptózis	21
2.5	Az oxidatív stressz hatása a spermasejtekre.....	23
2.6	Kosok termékenyítőképességét meghatározó tényezők.....	26
2.6.1	Fajta	26
2.6.2	Szezonális és klimatikus hatások	27
2.6.3	Takarmányozás	29
2.7	A hűtés hatása a spermiumokra.....	30
2.8	Antioxidánsok	32
2.8.1	Az antioxidáns enzimek.....	33
2.8.2	Nem enzimátikus védelmi rendszer	33
2.9	Zselatinok	35
2.10	Kurkumin.....	36
2.11	Nanoszelén	37
2.12	Az áramlási citometria működési elve	38
3	ANYAG ÉS MÓDSZER	39
3.1	Kos sperma eltartása zselatinos hígítóban +5°C-on.....	41
3.1.1	Motilitás, sűrűség meghatározása	41
3.1.2	Membránintegritás, akroszóma állapot vizsgálata.....	43
3.2	Kos sperma eltartása zselatinos hígítóban +5°C és +15°C-on	45
3.2.1	Motilitás, sűrűség meghatározása	45
3.2.2	Membránintegritás vizsgálata	46
3.2.3	Kapacitációs státusz meghatározása	48
3.2.4	Foszfatidilszerin transzlokáció meghatározása.....	50
3.2.5	A hűtés folyamata	51
3.3	Szelén takarmány kiegészítés hatása a spermatermelésére, vér szelén-tartalmára és az ondóplazma fehérje-összetételére	52

3.3.1	Motilitás és sűrűség meghatározása.....	53
3.3.2	Membránintegritás meghatározása	53
3.3.3	Ondóplazmafehérjék kivonása, azonosítása	53
3.3.4	Kétdimenziós poliakrilamid gélelektroforézis (2D-PAGE)	54
3.3.5	A fehérjék azonosítása LC-MS-módszerrel.....	55
3.3.6	A vér szeléntartalmának meghatározása.....	55
3.4	Az évszak hatása a spermatermelésre és herekörméretére.....	57
3.4.1	Motilitás, sűrűség, morfológia meghatározása	57
3.5	A kurkumin és ondóplazma plazma kiegészítés hatása a kos spermára	58
3.5.1	Sűrűség meghatározása.....	59
3.5.2	Membránintegritás, mitokondriális membránpotenciál vizsgálata.....	60
3.5.3	Kapacitációs státusz vizsgálata.....	61
3.5.4	Foszfadiliszerin transzlokáció vizsgálata	61
3.5.5	Caspase-3, -7 aktivitás meghatározása	62
3.5.6	DNS fragmentáció mértékének meghatározása	63
3.5.7	A hűtés folyamata	64
3.5.8	Peteburok kötődési teszt (ZBA-assay) a fertilitás meghatározására.....	65
3.5.9	In-vitro fertilizáció (IVF).....	66
3.5.10	Transzcervikális termékenyítés.....	67
3.5.11	Flow citométer	68
3.5.12	Statisztikai értékelés	68
4	EREDMÉNYEK.....	70
4.1	1/A kísérlet: Kos sperma eltartása zselatinos hígítóban +5°C és +15°C-on	70
4.2	Szelénes takarmány kiegészítés hatása a spermatermelésre, vér szeléntartalmára és az ondóplazma fehérjeösszetételére	77
4.3	Az évszak hatása a kosok spermatermelésre és here körméretére	83
4.4	A kurkumin és ondóplazma protein kiegészítés hatása a kos spermára.....	87
4.	kísérlet: A kurkumin és az ondóplazma protein kiegészítés hatása a +5°C-on tárolt kos spermára.....	87
4.5	A kurkumin és ondóplazma plazma kiegészítés hatása a +15°C-on tárolt kos spermára.....	94
5	KÖVETKEZTETÉSEK, JAVASLATOK.....	102
6	ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK.....	104
7	AZ EREDMÉNYEK GYAKORLATI HASZNOSÍTHATÓSÁGA	105
8	ÖSSZEFOGLALÁS	106
9	SUMMARY.....	109
10	IRODALOMJEGYZÉK	111
11	PUBLIKÁCIÓK AZ ÉRTEKEZÉS TÉMAKÖRÉBEN	133

12	ÁBRÁK JEGYZÉKE	137
13	TÁBLÁZATOK JEGYZÉKE.....	139
14	RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	140
15	KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	143
16	NYILATKOZATOK	145

1 BEVEZETÉS

A hazai juhágazatban a juhhús a legnagyobb jelentőséggel bíró gazdasági termék. A mesterséges termékenyítés korában a hústermelés mértéke az egyedi hústermelő képesség fokozásán túl, a szaporodóképesség javításával is növelhető. A fejlett állattenyésztési kultúrával rendelkező országok a mesterséges termékenyítés előnyeit is kihasználva igyekeznek megőrizni versenyképességüket, mivel ezzel a biotechnikai módszerrel viszonylag rövid idő alatt, gyors genetikai előrehaladás érhető el (PÉCSI T., 2007). A mesterséges termékenyítés alkalmazásával a csúcstermelésű ún. rekorder egyedektől lényegesen több utód nyerhető, mint természetes körülmények között ez remélhető lenne (VASS és mtsai, 2008). Az ejakulátum több részre osztásával lecsökkenthető a szaporításban részt vevő apaállatok száma, ezáltal növelhető az állományon belüli szelekciós nyomás. A nagy szervezeti szilárdsággal rendelkező, jó konstitúciójú, nagy élettéljesítményre képes kosok után rövid idő alatt, egyöntetű, magasabb termelési szintű utódállomány hozható létre, ami a versenyképes piaci termelés egyik legfőbb alapja (PÉCSI A., 2007). Az asszisztált reprodukciós technikák alkalmazásának nemcsak az intenzív állattenyésztésben, hanem az őshonos valamint vadon élő ritka állatok megmentésében is kulcsszerepe van (SOLTI és mtsai, 2000; CSEH és SOLTI, 2001). A juh -mint kísérleti állat- számos asszisztált reprodukciós technikai módszer kifejlesztésében játszott szerepet. Először ezen az állatfajon kezdték el alkalmazni az ivarzásszinkronizálásnak nevezett módszert, ami később klasszikus elvi alapjául szolgált a humán fogamzásgátlásnak is (LÁTITS, 2011).

Hazánkban az utóbbi évtizedben visszaesett a biotechnikai, biotechnológiai módszerek alkalmazása, ami több tényező együttes hatásának köszönhető, pedig az ivarsejtek mélyhűtése közel 50 éves múltra tekint vissza. Az 1960-as években a hazai anyajuh állomány közel 60%-át termékenyítették, jelenleg ez a 2%-ot sem éri el (KUKOVICS és GERGÁTZ, 2009). A mesterséges termékenyítés fellendítése elsősorban azoknál a fajtáknál lenne kívánatos, amelyek végtermék előállító keresztezésben vagy génmegőrző programban vesznek részt. A szarvasmarha ágazatban több évtizede bevett gyakorlat a bikák spermatermelésre, laboratóriumi minőségre, mélyhűthetőségre és fertilitásra történő generációk óta folytatott szelekciója, míg a juhoknál ez a mai napig egy megvalósításra váró feladat. A kosok tudatos szelekciójának hiánya is szerepet játszik abban, hogy a több napon át hűtött/fagyasztott spermával történő mesterséges termékenyítés eredményessége elmarad a várható

eredményektől. A szaporodásbiológiai mutatók javítása az ágazat versenyképességének fejlesztése és a génmegőrzés érdekében rendkívül fontos lenne a termékenyítő anyag minőségi ellenőrzése, a spermakonzerválási eljárások javítása, továbbfejlesztése.

A mesterséges termékenyítés folyamatában az egyik legnagyobb szerepe a kiválasztott tenyészkosnak van, mert igen nagyszámú utódja által javíthat vagy ronthat az állomány minőségén, ezért kiválasztása során kritikusabban lehet és kell szelektálni a rendelkezésre álló állományt. Kiválasztás esetén az apaállatnak az alábbi követelményeknek megfelelnie:

- Kifogástalan egészségi állapot (negatív eredményű szerológiai vizsgálat)
- Jó kezelhetőség (ápolóját ne veszélyeztesse, társait ne zavarja, tartásrendet ne bontsa meg)
- Használatot korlátozó rendellenességektől (alaktani rendellenességek) mentes legyen
- A nemi szervek kifogástalan anatómiai és funkcionális állapotúak (herezacskó, herék, mellékherék, ondózsínór, tasak, hímvessző ellenőrzése) legyenek
- A fajra jellemző nemi magatartást mutassa (párizóképesség, normális nemi reflexfolyamat)
- Az ondó megfelelő biológiai minőségű legyen (részletes spermatológiai vizsgálat)
- Az ondó kifogástalan bakteriológiai eredménnyel rendelkezzen (patogén csírától mentes, alacsony összcsíraszám) (GERGÁTZ, 2007).

A spermiumok épségének megállapításakor -különösen mélyhűtött/felolvasztott minták esetében- nagy szerepet játszik a feji részt borító plazmamembrán ún. akroszóma vizsgálata, mivel a hűtés és felolvasztás folyamata a kapacitációhoz hasonló élettani változásokat idéz elő (WATSON, 1995). Az akroszóma leválás mértéke védőanyagok (antioxidánsok) hozzáadásával csökkenthető (TORRE és mtsai, 2007). A humán spermiumok mellett a kos ondósejtjei is rendkívül érzékenyek a hőmérsékletváltozásra, emiatt mélyhűtés és felolvasztás után a termékenyítő anyagban a motilis, akroszómával rendelkező sejtek aránya ritkán haladja meg a 40%-ot, ami rontja a termékenyülés eredményességét. NAGY (1998), DEN DAAS és mtsai (1998), CHENOWETHH (2005), SAACKE (2008) a spermiummorfológiai anomáliák vizsgálatára hívják fel a figyelmet, kiemelt jelentőséggel a kompenzálható és nem kompenzálható spermium rendellenességekre. Nem kompenzálható defektussal rendelkeznek azok a sejtek, melyek ugyan képesek a petesejt termékenyítésére,

de az embrionális fejlődés már zavart szenved. A spermiumfej elváltozását okozó diadém defektus az egyik legjelentősebb képviselője a csoportnak. A kompenzálható rendellenességek csoportjába az immotilis, éretlen, torzult fejű, farokrendellenességgel rendelkező spermiumok tartoznak. Kompenzálható rendellenesség esetében, ha megemeljük a termékenyítő anyag koncentrációját (ezáltal a motilitás sejtek számát az ondóban), úgy a termékenyülés esélye tovább is nagy marad, még ha sok a rendellenes sejt is van, de a nem kompenzálható defektusok esetén a koncentráció növekedése sem növeli a sikeres termékenyülés esélyét.

CÉLKITŰZÉSEK

Dolgozatomban olyan tényezőket vizsgáltam, melyek segítségével hatékonyabbá tehető a hűtött spermával történő termékenyítés eredményessége, illetve a mesterséges termékenyítésre szánt tenyészállatok szelekciója.

A vizsgálatokat négy fő téma köré csoportosítottam:

1. Kos spermiumoknál gyakran előforduló jelenség, hogy hidegsokk hatására a sejtek elvesztik akroszómájukat. Az első kísérlet célja a zselatin és a nátrium-alginát akroszómavédő hatásának vizsgálata a sperma több napos hűtve tárolása során.
2. A második kísérlet célja az elemi nano-szelén hatásának tanulmányozása. A kutatásban a spermaminőséget, vér szeléntartalmát és az ondóplazma fehérje profilját vizsgáltam.
3. A harmadik tanulmány célja annak megállapítása, hogyan változik dorper kosok spermaminősége és herekörmérete a különböző évszakokban.
4. A negyedik vizsgálat célja az ondóplazma fehérjék és a kurkumin antioxidáns hatásának vizsgálata in vitro és in vivo körülmények között a sperma több napos hűtve tárolása során.

2 IRODALMI ÁTTEKINTÉS

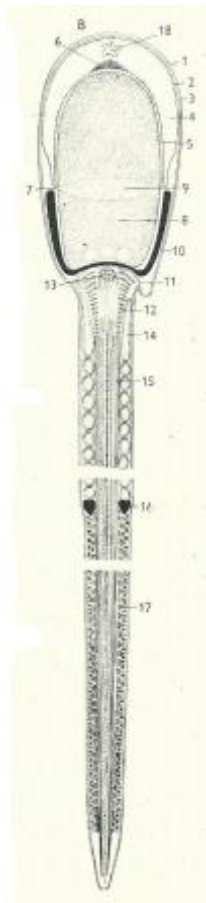
2.1 A spermium morfológiája

Az ondósejteken fej, nyak, középdarab és fark rész különböztethető meg. A fej a sejtmagból, a nyak a sejtközpontról, a törzs és a fark a sejt plazmájából alakult ki (VERESS, 1982, SZÁSZ, 2007). A spermiumfej magállományból, sűrű, homogén kromatinból tevődik össze. A sejtmag mátrixa és kromatin állománya, asszimmetrikus elrendeződésű, amely sűrűbb a mag egyik éle, valamint a nyak közelében. Ez az asszimetria biztosíthatja az ondósejt egyensúlyát mozgás közben, amikor a fej élére állva, kissé oldalra billegve halad előre. Ha lassul a sejt mozgása, akkor fokozódik a fej kilengése, majd álló helyzetben a spermium feje a lapjára fekszik (KOVÁCS és FEHÉR, 1973).

Az ondósejtek fejét kívülről vékony sejthártya borítja, amely a többi rész külső burkát is képezi. A fej elülső részének felét vagy kétharmadát a Golgi-apparátusból alakult, lapos tömlőhöz hasonló fejsapka vagy más néven akroszóma fedi, mely a lizoszómák egy speciális változata. Az akroszóma az ún. sajátos rajzolatú fibrillumok alkotta mátrixból áll, melyet az akroszómális membrán vesz körül. Az akroszóma vakuolom kettős falú sapkához hasonlóan veszi körül a sejtmag elülső felét, ami kifelé a sejthártyával áll szorosan összeköttetésben befelé, a maghártyától a szubakroszómális tér választja el (BECZE, 1983). Az akroszóma csúcán, a belső lemeze alatt, a perforatorium található, amely sejthártya vastagságú. Az akroszóma üregének elülső része tágabb, a fej közepe tájékán (pars intermedia) hirtelen szűkül (ekvatoriális szegmentum), majd vakon végződik. Ezen a helyen a legellenállóképesebb az akroszóma fala, mivel kénben gazdag (4%) fehérjéből épül fel, amelynek oldhatósága rendkívül alacsony. A membrán anyaga 19,3% nitrogént és 11,4% ciszteint tartalmaz, ami a spermium fejének rugalmasságát biztosítja (KOVÁCS és FEHÉR, 1973). Az akroszóma továbbá hialuronidáz és akrozin enzimeket is tartalmaz (SARLÓS, 1999). Az akroszómában lévő hialuronidáz és akrozin enzimek az akroszómareakció folyamata során szabadulnak ki az akroszóma sapka alól. Az enzimek hatására a petesejt burka lebomlik, és a spermium bejut a petesejtbe (KISS, 2007).

A spermium feji részét a nyak követi, melynek részei: a bazális lemez, centriólumok, az ebből származó 11 rostköteg, az ezt körülvevő nyaklemez vagy gyökér

és a mitokondriális hüvely. A nyak után a középrész következik, mely nem különül el élesen a nyaktól. Részei a tengelyszálak, belső rostos hüvely, külső rostos hüvely, mitokondriális hüvely, citoplazmahüvely és a sejthártya. A fark középrésze, mely henger alakú, és magában foglalja mindazokat az alakelemeket, amelyek a fark és az ondósejt mozgásának feltételeit biztosítják. A fark harmadik egysége a főrész, ami az annulusztól kezdődik. Alapját a két centrális tengelyfonál és az azt körülvevő belső rostos hüvely alkotja, amit az ún. spirális hüvely borít. A végdarab már nincs spirális hüvellyel borítva. Végül a tengelyből is csak a két egymástól is elkülönült, szabadon levő filamentum marad. Ezeket vékony citoplazma és sejthártya borítja (BECZE, 1983, KOVÁCS és FEHÉR, 1973).



1. sejthártya
2. citoplazma
3. a fejsapka (galea capitis) külső fala
4. ürege
5. belső fala
6. perforatórium
7. maghártya
8. sejtmag
9. aequatoriális szegment
10. poszt nukleáris sapka
11. bazális lemez
12. nyaklemez vagy gyökér
13. centriólum a belőle eredő 11 rosttal
14. mitokondrium hüvely
15. külső rostos hüvely
16. Jensen-féle zárógyűrű
17. spirális hüvely
18. apikális test

1. ábra: Az ondósejt szerkezete
(Forrás: KOVÁCS és FEHÉR, 1973)

2.2 Az ondóplazma összetétele

Az ondóplazma a spermiumok védelmét, táplálását biztosító közeg, mely szerves és szervetlen anyagokban egyaránt gazdag. A here, mellékhere, ondóvezető ampulláris mirigyei, ondóhólyag, prosztatata, Cowper-féle mirigy és a húgycső Littre-féle mirigyei termelik a szeminális plazmát, melynek összetétele: 80-90% víz, szárazanyagtartalma 10-20%. A másodlagos nemi mirigyek váladéka kolloid természetű anyag, melyet a benne lévő albuminok és globulinok biztosítanak. Az előbb említett fehérjék határozzák meg a plazma ozmózis nyomását, és közrejátszanak a pH-érték fenntartásában is (MAXWELL és mtsai, 2007). Az ondóban található fehérjék egy része a spermium fejének membránjához kötődik, ami elősegíti a kapacitáció és a fertilizációs folyamat lezajlását (YANAGIMACHI, 1994a), valamint jelentős szerepük van a spermasejtek motilitásának és életképességének fenntartásában és a hűtés során fellépő hideg sokk hatását is képesek tompítani (GRAHAM, 1994; MAXWELL és mtsai, 1997).

A szeminális plazma aminosavakat is tartalmaz, melynek 50%-a glutaminsav, a benne lévő nitrogén 90%-a fehérjéhez kötött, 10%-a ammónium, húgysav és karbamid formájában található. Az ondóplazma fruktóz tartalma 2-5 mg/mL, amely elsősorban a vércukorból szintetizálódik, továbbá proteolitikus enzimek, foszfatázok (savi a prosztatából, lúgos az ondóhólyagból), glükózidáz, kolinszteráz, transzamináz, hexokináz, dehidrogenáz, ATP-áz, hialuronidáz enzimek katalizálják a spermiumok anyagcsere- és életfolyamatait.

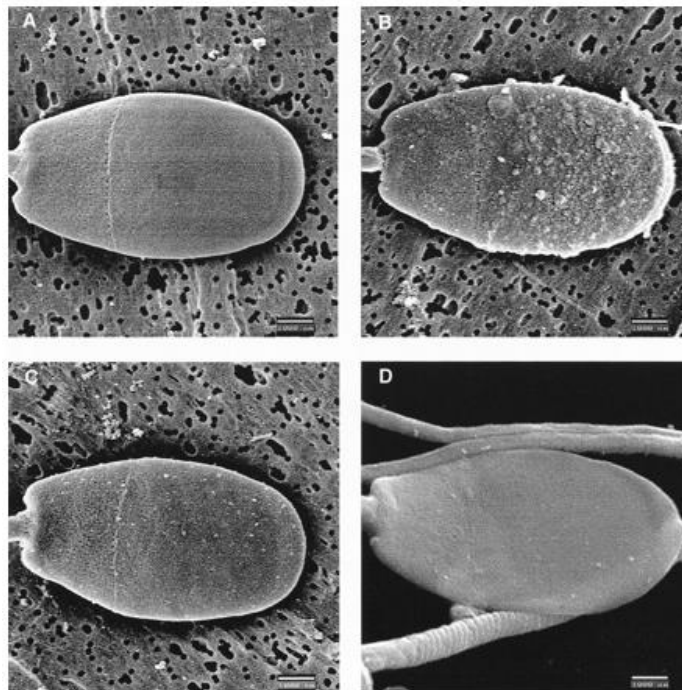
Vitaminok közül a vízben oldódó C-vitamin (aszcorbinsav), inozit, riboflavin, lipidok közül a lecitin, kis mennyiségben a koleszterin, valamint di-és trigliceridek a meghatározóak. Szerves savak közül a legjelentősebb a tejsav, acetát, piruvát, citrát, szukcinát. Szervetlen anyagok közül a Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} kationok jelentősek, melyek nagy mennyiségben káros hatásúak a negatív töltésű ondósejtre, mivel képesek agglutinációt okozni azáltal, hogy a spermiumok töltését semlegesítik. Anionok közül a citrátok, bikarbonátok és foszfátok a legjelentősebb alkotók (ASADPOUR, 2012; JUYENA és STELLETTA, 2012; KOVÁCS és FEHÉR, 1973).

2.3 Ondóplazma fehérjék

A járulékos nemi mirigyek által termelt ondóplazma hormonokat, enzimeket, szénhidrátokat és fehérjéket tartalmaz, melyek a spermasejtek számára az aktív mozgásukhoz szükséges energiát biztosítják. A plazmában található fehérjék a

kapacitáció és a petesejthez való kötődés folyamatában játszanak kulcsszerepet (YANAGIMACHI, 1994b). Az ondóplazma alkotóelemei hatással vannak a spermiumok életképességére. DOT és mtsai (1979) az előbbi állítást azzal igazolták, hogy amennyiben az ondóplazma kihígításra kerül, és koncentrációja nagymértékben lecsökken, úgy a spermiumok is fokozatosan elvesztik életképességüket. Kossperma esetében a szeminális plazma fehérjék pozitívan befolyásolják a spermiumok motilitását és membránintegritását (GRAHAM 1994, MAXWELL és mtsai, 1997). OLLERO és mtsai (1997) munkájában olvasható, hogy a hipoozmotikus sokk negatív hatását a spermasejtek felületén megkötődő ondóplazma fehérjék csökkenteni képesek.

A kos spermiumok membránja hidegsokk hatására jelentős mértékben képes károsodni, érzékenysége a humán ondósejtekénél is nagyobb (HOLT és NORTH, 1984). A hűtési, fagyasztási/felolvasztási folyamat során fellépő stressz hatására a sejtek nagy arányban képesek elveszíteni akroszómájukat, ami jelentősen csökkentheti a termékenyülés eredményességét (2. ábra).



2. ábra: A hidegsokk hatása a spermiumokra

A: ép akroszómával rendelkező kos spermium swim-up után; B: hidegsokk hatására bekövetkezett akroszóma felhólyagosodás; C-D: ondóplazma proteinnel (0,7mg/mL) ekvibrált spermasejt hűtés követően, melynek akroszóma membránja részben regenerálódott a protein kiegészítés hatására

(Forrás: BARRIOS és mtsai, 2000)

BARRIOS és mtsai (2005) azt vizsgálták, hogy az ondóplazma fehérjéi, hogyan képesek megvédeni a spermiumok membránját a hidegsokk hatástól. Kísérletükben dextrans/swim-up technikával szétválasztották a spermiumokat az ondóplazmától, majd a spermát swim-up médiummal hígították, ami 0,1-2,5mg/mL ondóplazma fehérjét tartalmazott. Hígítást követően a mintákat 1h-ig 20°C-on tartották, hogy hidegsokkot hatást idézzenek elő, majd fluoreszcens festés segítségével (CFDA/PI) vizsgálták a spermiumok membránintegritását. Eredményeik alapján arra a következtetésre jutottak, hogy az 1,4mg/mL plazmaproteint kiegészítés volt a leghatékonyabb, mert ebben az esetben 83%-volt a membránintakt sejtek aránya, ami a hűtés előtti eredményekkel közel azonos volt.

A későbbi kutatások már specifikusabban foglalkoztak az ondóplazmafehérjék szerepével és a különböző fehérjefrakciók hatásának vizsgálata került a vizsgálatok középpontjába. A hideg sokk okozta membránkárosodást a 20kDa molekulású fehérje hatékonyan képes csökkenteni, amelyről a korábbiakban már kimutatták, hogy kapacitáció során a tirozin-foszforilációjának gátlását okozza, amely így az intracelluláris Ca^{2+} mennyiségének növekedését késlelteti (PÉREZ-PÉ és mtsai, 2002). BARRIOS és mtsai munkájukban (2005) a 14kDa molekulású (P14) és a 20kDa molekulású (P20) spermafehérjék hatását tanulmányozták és arra keresték a választ, hogy a P14 és P20 fehérjék hogyan befolyásolják kos spermiumok kapacitációját, akroszómareakcióját és a hidegsokk hatásra adott válaszát. Eredményeik alapján azt a következtetést vonták le, hogy a P20 fehérjék mindössze 35%-a kötődött a spermiumok felszínéhez akroszómareakciót követően, de leválásuk a sejt membránjáról a kapacitáció folyamata során indult meg. Tapasztalataik alapján mindkét fehérje a spermasejt számos részén képesek megkötődni, de legnagyobb számban az ekvatoriális és posztekvatoriális régióban. Mindezen eredmények azt támasztják alá, hogy a P14 és P20 fehérjéknek a spermamembrán stabilizálásában van szerepük és emellett dekapacitációs faktorok is.

JOBIM és mtsai (2005) kosondó szemínális plazma profilját határozták meg kétdimenziós polikarilamid gélelektroforézis (2D-PAGE) segítségével és összesen 21 fehérjét azonosítottak, melyek molekulásúlya 15kDa és 115 kDa között volt. A legtöbb fehérjét a 30 kDa alatti tartományban azonosították, de a legintenzívebben a 3 (Mw: 18-19 kDa, pI 4,8-5,0), 5 (Mw: 17-18 kDa, pI 5,0-5,2), 7 (Mw: 15-16 kDa, pI 6,2-6,4) és a 23 (Mw: 105-108 kDa, pI 6,8-7,0) fehérjepontok festődtek. A 3 és 5-ös fehérjéket western-blot segítségével azonosították, melyek a BSP A1/A2 (Mw: 16,5, pI 4,7-5,0 és Mw: 16kDa, pI 4,9-5,2) fehérjékhez hasonlóak,

melyet MANJUNATH és SAIRAM (1987) a bika ondóplazma fő proteinjeként határozott meg. A 7-es fehérjepont a TIMP-2 (tissue inhibitor of metalloproteinase-2) fehérje, ami a mártix-metalloproteináz enzim inhibitora, amely a kos mellékhere folyadékában szintetizálódik. A metalloproteinázok cink proteázok, melyek az apoptózis folyamatában és a mártix újrendeződésben játszanak szerepet. Jelenleg még kevés információ áll rendelkezésre a pontos funkciójukról, de feltételezhetően a kanyarulat csatornában folyó spermatranszportban vesznek részt (METAYER és mtsai, 2002; WOLFSBERG és mtsai, 1995). A 17 (33–35 kDa, pI 7.8–8.0), 23 (105–108 kDa, pI 6.8–7.0), 35 (75–78 kDa, pI 6.5–6.8), és 41 (65–67 kDa, pI 6.7–7.0) fehérjék a mártix metallopeptidáz enzimsoporthoz tartoznak, molekulatömegük és az izoelektromos pontjuk hasonlósága alapján. A csoportba tartozó fehérjék a szövetalkotásban és a sejt-sejt közötti interakcióban (GUNNARSSON és mtsai, 1999; HOEBEN és mtsai, 1996) vesznek részt. A 9-es fehérje (21–23 kDa, pI 6.5–6.7) a prosztaglandin D2 szintetáz (PGDS), ami a mellékherében termelődő szállítófehérje (FOUCHECOURT és mtsai, 2002). A fehérje a lipocalin proteincsalád tagja, melyek a lipofil molekulák szállításáért felelősek, mint például a prosztaglandin (PERVAIZ és BREW, 1987). A 13-as fehérje (28–30 kDa, pI 3.3–3.5) a 30 kDa molekulatömegű Bovine Seminal Plasma protein (BSP), amely a legsavasabb fehérje a BSP protein családban (MANJUNATH és SAIRAM, 1987). A 15-ös fehérje (21–23 kDa, pI 6.5–6.7) a clusterin fehérje, amely a here szekrétumának fő glikoproteinje, mely a Sertoli sejtekben szintetizálódik (BLASCHUK és mtsai, 1983) és a spermium érését befolyásolja (SYLVESTER és mtsai, 1991). JOBIM és mtsai (2004) szerint magas clusterin koncentrációjú bikasperma fagyaszthatósága is jobb.

2.4 Az ondósejtek életjelenségei

2.4.1 Motilitás

Az ondósejtek legjellemzőbb tulajdonsága az élénk előrehaladó mozgás, ami a fark 2-3 dimenzióban folyó, hullámszerű elhúzóadásából alakul ki, ekkor a farkon átlagosan másodpercenként 9 hullám halad végig. A mozgáshoz a kezdőimpulzus a bazális granulumból indul ki, amit a külső és a belső rostok egymásnak átadva, körkörösen, hullámszerűen vezetnek egymás között. A kos spermiumának sebessége kedvező körülmények között 200-250 $\mu\text{m/s}$, bika 100-352 $\mu\text{m/s}$, mén 80-100 $\mu\text{m/s}$.

A spermiumok a nőivar nemi csatornájában élnek, rendezett, egyenes vonalú, előrehaladó mozgást végeznek. Az enyhén savas (pH=6,3-6,9) kémhatás serkentőleg hat a mozgásra, viszont ha a pH semleges vagy annál magasabb, az már károsítja az ondósejteket (KOVÁCS és FEHÉR, 1973). Az enyhén savas kémhatás és a szembejövő folyadékáram (pozitív rheotaxis) élénkíti a sejtek mozgását, illetve a spermiumot körülvevő közeg viszkozitása, ozmotikus nyomása és a környezet hőmérséklete is hatással van a sejtek motilitására (MIKI és CLAPHMAN, 2013). Az ondósejteknél megfigyelhető mozgásforma a körben mozgás (manézs mozgás) vagy az egy helyben csapkodó mozgás (oszcilláló mozgás), de az ún. rákmozgás is lehetséges, mely kóros mozgásformával rendelkező sejtek általában csökkent fertilitásúak (DE JONGE és BARRATT, 2006). HARASZTI (1987) alátámasztja az előbbi megállapítást és a mozgás rendezettségét azzal magyarázza, hogy az ondósejtek fejének felülete negatív, a fark felülete pozitív elektromos töltésű. „Az elektromos töltés élettani jelentősége, hogy összerendezett mozgást tesz lehetővé és megakadályozza a spermiumok összeütközését”.

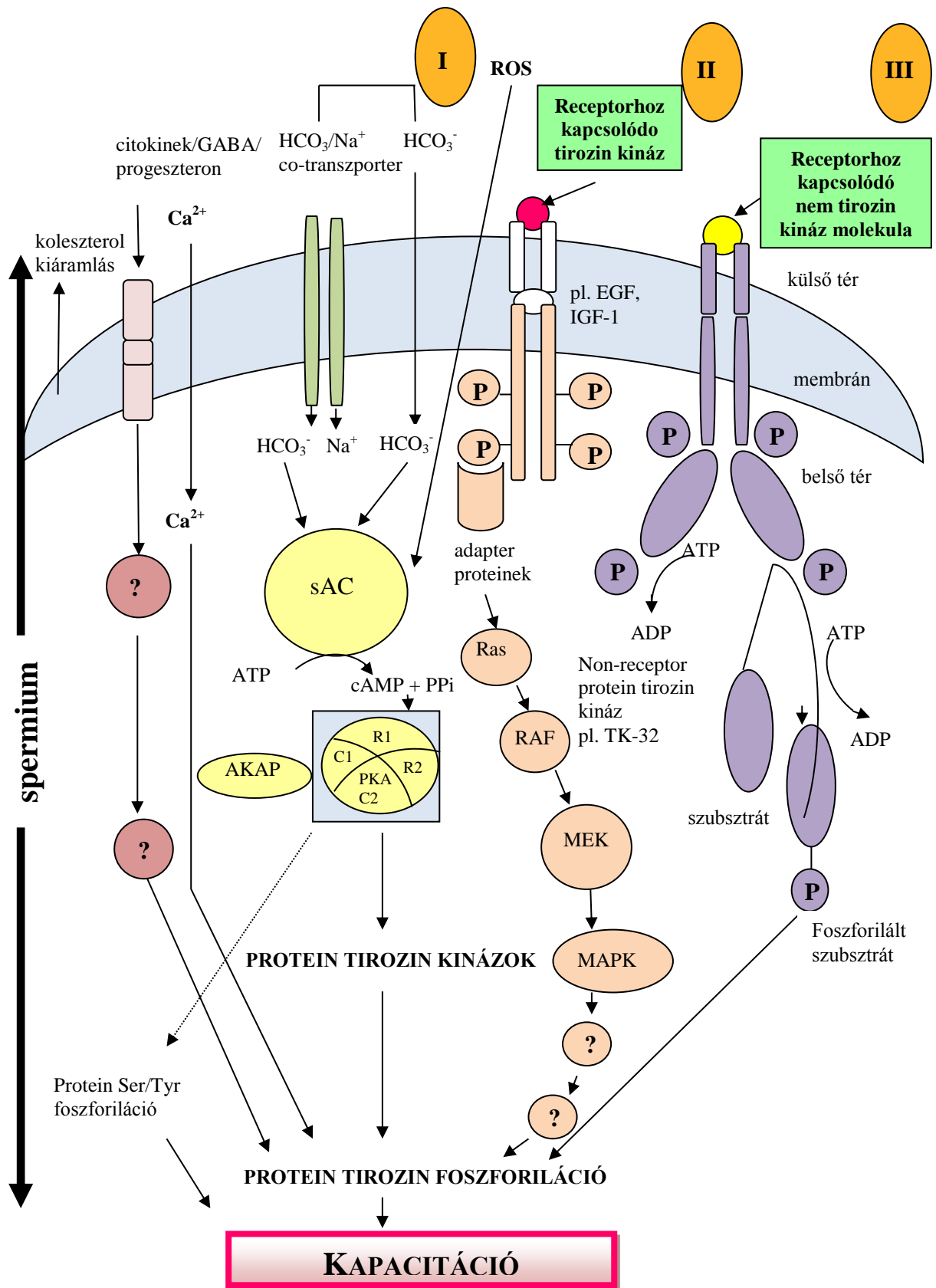
A motilitás meghatározása történhet mikroszkóp segítségével vagy CASA (Computer Assisted Sperm Analysis) rendszerrel, melynek ma már több változatát (ISAS, CASPAR, SM-CMA) is ismerjük (MORTIMER és MORTIMER, 2013; GÁBOR és mtsai, 2002). A gyakorlatban még jelenleg is alkalmazott technika a szubjektív motilitásbírálat. MORTIMER (1994) úgy véli, hogy a módszer ismételhetősége alacsony és hátránya, hogy csak a megfelelő tapasztalattal rendelkező bíráló tudja elvégezni az értékelést. Emiatt javasolja a mikroszkópos és a CASA együttes alkalmazását. A számítógéppel végzett motilitásvizsgálat előnye, hogy rövid idő alatt, több száz sejtet lehet elbírálni és precízebb információt szolgáltat a sejtek progresszív motilitásáról, különböző mozgásformákról. Hátránya, hogy az aglutinált spermápopulációt az értékelésnél nem veszi figyelembe (HOLT és mtsai, 2007).

2.4.2 Kapacitáció

A kapacitáció a spermiumok érésének végső folyamata, amely a női nemi traktusban megy végbe. A kapacitáció folyamatát először AUSTIN (1951) és CHANG (1951) írták le egymástól függetlenül. Megállapításuk szerint a kapacitáció egy olyan komplex élettani folyamat, mely a női nemi traktusban játszódik le és alapfeltétele a petesejt megtermékenyítésének. Bár napjainkban sem tisztázott még a

folyamat pontos háttere, annyi bizonyos, hogy a kapacitáció lejátszódása ahhoz szükséges, hogy a spermium be tudjon hatolni a petesejtbe (GRASA és mtsai, 2009).

A spermium külső membránján található kötő fehérjék a peteburok ZP3 fehérjéjéhez kapcsolódnak, majd csökken spermium membrán koleszterol/foszfolipid aránya, amely a sejtmembrán fluiditásának növekedéséhez vezet. Kötődés hatására megnyílnak a membrán Ca^{2+} csatornái, melynek következtében megnő az intracelluláris Ca^{2+} , cAMP mennyiség, csökken az intracelluláris pH és az akroszómális bontóenzimek kiszabadulnak. A folyamat lejátszódása során a sejteket hiperaktív mozgás jellemzi, és fokozódik a sejtek energia leadása. Egyes fajok esetében a kapacitáció folyamatát elindító egyik kulcsmolekula a bikarbonát, amely a membrán lipidszerkezetének változásait indukálja, de a megemelkedett ROS (reaktív oxigénszármazékok) koncentráció szintén hatással van a kapacitáció lejátszódására és a hiperaktív mozgás kiváltására (3. ábra) (BALDI és mtsai, 1996; GADELLA és mtsai, 2008; LUCONI és mtsai, 1996; VREDENBURGH-WILBERG és PARRISH, 1995; YANAGIMACHI, 1994a). Miután a hímivarsejt fellazította a glükoproteidekből álló zona pellucidát és bejutott a petesejtbe, az oocita citoplazmájában található granulumokból nagy mennyiségű bontó enzim ürül a sejt felszínére, felszámolva a ZP3 receptorokat, ezzel megakadályozva egy újabb hímivarsejttel való egyesülést (MILLER és mtsai, 1992; AUSTIN, 1970). Emlős spermiumok esetében a fokozott fehérje tirozin foszforiláció összefüggésben van a kapacitált sejtek számának növekedésével (TARDIF és mtsai, 2001; POMMER és mtsai, 2003). A kapacitációval összefüggő fehérje tirozin foszforilációt a kalcium, BSA (Bovine Serum Albumin), NaHCO_3 koncentrációja befolyásolja, amelyek iránt eltérő a különböző fajok spermájának érzékenysége. Kos spermiumok kapacitációja 1-2 óra alatt megy végbe (NAZ és RAJESH, 2004).



3. ábra: A kapacitáció folyamata

(Forrás: NAZ és RAJESH, 2004)

Egér spermiumok kapacitációját a kalcium, BSA, NaHCO_3^- együttes jelenlététől függ, míg kan spermiumok in vitro kapacitációjához a BSA nem szükséges (BAKER és mtsai, 2004, TARDIF és mtsai, 2003). GRASA és mtsai (2006) azt vizsgálták, hogy mely molekulák indukálják a kos spermiumok kapacitációját és arra a következtetésre jutottak, hogy a BSA és a kalcium koncentrációja nem volt hatással a tirozin foszforilációjára, míg a HCO_3^- szint növekedése fokozta a kapacitáció mértékét. A kalcium szintje ugyan nem befolyásolta a kapacitáció mértékét, de az akroszómareakció intenzitását fokozta.

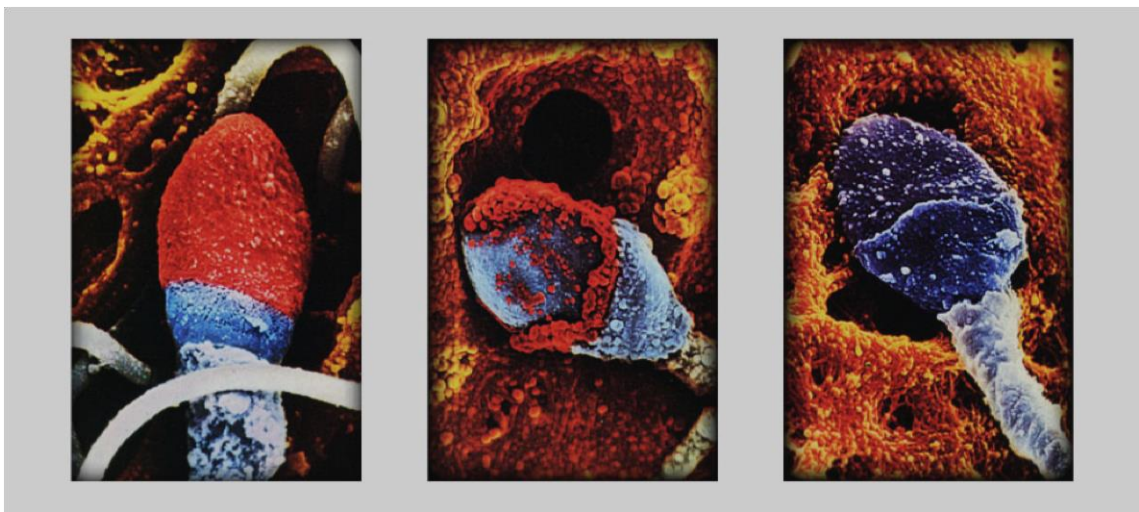
Az annexin V fehérje könnyen kapcsolódik a kromofórt tartalmazó FITC vagy PE molekulákhoz, így a kapacitált sejtek flow-citóméter vagy fluoreszcens mikroszkóp segítségével detektálhatóak. A már elhalt sejtek jelölésére propidium-jodiddal (PI) történő egyidejű festési eljárás alkalmazása javasolható (MARTÍ és mtsai, 2008; PAASCH és mtsai, 2004, SAID és mtsai, 2004). Az kapacitáció egyik detektálható jele a plazmamembránt (PM) alkotó foszfatidil szerin (PS) átfordulása a sejtmembrán belső oldaláról annak külső felszínére. Ennek hatására a PS kötőhelye az annexin V számára (319 aminosavból álló antikoaguláns fehérje (molekulasúly: 35 kD) szabaddá válik. A PS transzlokáció a Ca^{2+} függő kötődés igazolásával mutatható ki.

2.4.3 Akroszóma reakció

Az emlősállatok spermiumának egy Ca^{2+} dependens exocitózison kell átesni, mielőtt megtermékenyítenék a petesejtet. Ezt a folyamatot akroszóma reakciónak nevezzük. A kapacitáció és az akroszómareakció egy összekapcsolt folyamat, mivel a kapacitációban részt vevő effektorok szerepet játszanak az akroszóma reakcióban részt vevő enzimek aktiválásában is. Kapacitáció során megnő az intracelluláris Ca^{2+} mennyisége és a fehérjék tirozin foszforilációja, ami az akroszóma reakció során végbemenő exocitózis egyik előfeltétele (BALDI és mtsai, 1991; AITKEN és mtsai, 1998).

In vivo körülmények között az alábbi molekulák játszanak fontos szerepet az akroszómareakció előidézésében: Zona pellucida sperm binding protein-3 (ZP3), szérum albumin, epidermális növekedési faktor (EGF), atriális nátriuretikus hormon (ANP), vérlemezke aktiváló faktor (PAF), progeszteron (P), ATP, prosztaglandin E1 (PGE1) (BALDI és mtsai, 2000). A női nemi traktusban a spermium külső akroszómális

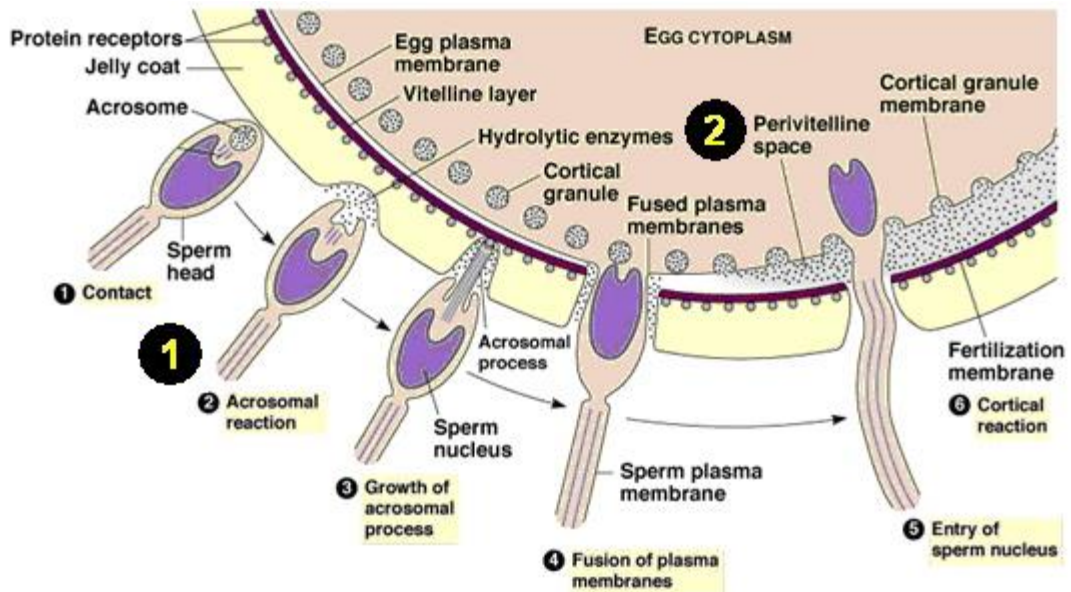
membránján található kötő fehérjék a peteburok ZP3 fehérjeihez kapcsolódnak, ami kiváltja a spermiumok akroszóma reakcióját. A ZP3 által vezérelt utat az ún. guanin nukleotid kötő proteinek (G proteinek) stimulálják, viszont ezek nem vesznek részt a progeszteron által indukált folyamatban (WASSARMAN, 1999). A spermiumok fehérjei először a ZP3 fehérjékkel kapcsolódnak össze, majd ezt követi a progeszteron receptorokkal való összekapcsolódás (TESARIK és MENDOZA, 1993). A sejten belül megemelkedett Ca^{2+} koncentráció az akroszóma vezikulum exocitózisához, felhólyagosodásához vezet, majd kiszabadul a penetrációhoz szükséges hialuronidáz és a tripszinszerű akrozin enzim (4. ábra).



4. ábra: Az akroszómareakció folyamata

(Forrás: NILSSON, 1990)

A hialuronidáz szerepe, hogy elfolyósítja a méhnyak nyálkahártyáját, majd a mukopoliszacharidokat hidrolizálja a petesejt corona radiata rétegében és emészti a benne található hialuronsavat (PATRAT és mtsai, 2000; YANAMIGACHI, 2011). Az ondó hialuronidáz tartalma egyenes arányban áll az ondósejtek számával, emiatt van szükség nagyszámú ondósejtre, hogy a fentebb említett folyamatok végbemehessenek és oligospermia esetén ezért nem következik be termékenyülés. Az akrozin enzim egy $10\mu\text{m}$ átmérőjű nyílást hoz létre a corona radiata rétegben, amin keresztül az akroszómáját vesztett spermium eljut az oolemához (KOVÁCS és FEHÉR, 1973) (5. ábra).



5. ábra: A penetráció folyamata

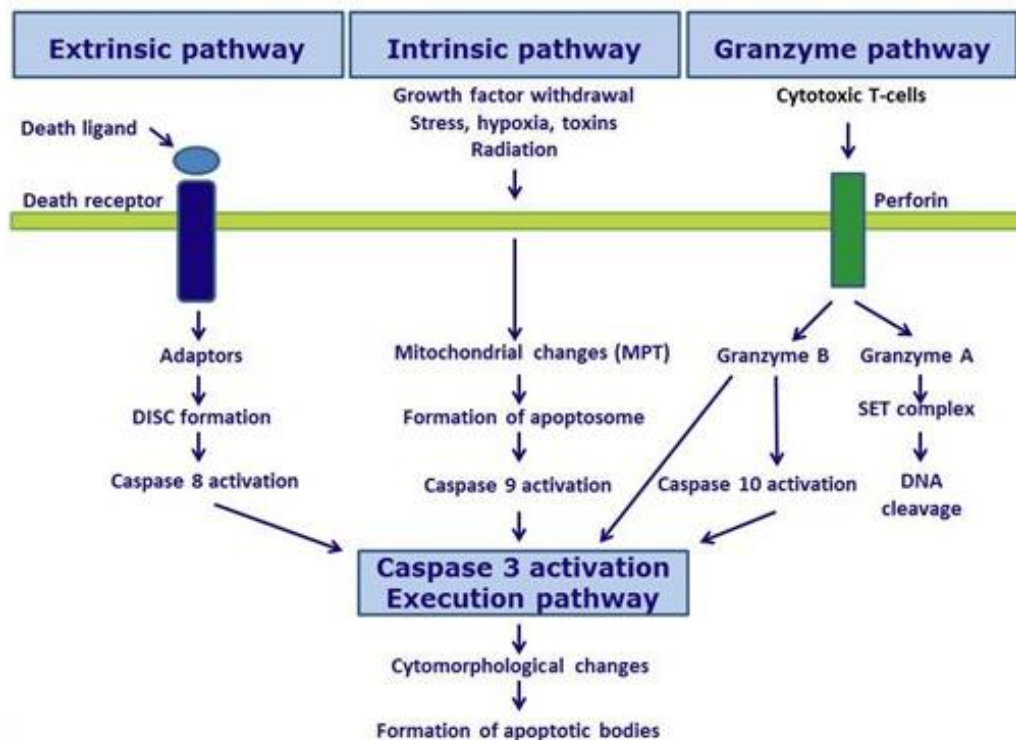
(Forrás: INOUE és mtsai, 2005)

2.4.4 Apoptózis

A sejthalál nekrozis vagy apoptózis útján következik be. A nekrozis egy passzív folyamat, amely a sejt sérülése során jön létre. Ennek eredménye, hogy a darabjaira esett sejtéből sejtalkotók áramlanak a sejt közötti térbe, gyulladást és további sejt- vagy szövetkárosodást idézve elő. Ezzel szemben az apoptózis a sejt membránváltozásával, zsugorodásával, sejtmagi DNS kondenzációval, fragmentációval járó folyamat, amelynek meghatározott, egymást követő lépései vannak (WYLLIE és mtsai, 1980). Az apoptózis folyamatát több jelátviteli út szabályozza. Az apoptikus enzim kaszkád (kaspáz) szabályozásának két fő útja ismert: az egyik a mitokondriális funkciót érinti (intrinsic útvonal), a másik útvonal az adapter fehérjéken keresztül direkt továbbítja a jelet a kaspáz kaszkád aktivizálásához (extrinsic útvonal). A kaspázok cisztein-függő aszpartát irányította proteáz család tagjai, melyek gyors aktivációra képesek. Két csoportjukat lehet elkülöníteni, az iniciátor kaspázokat (kaspáz-2, -8, -9 és -10), melyek az effektor kaspázok inaktív, pro-formáit hasítják, miközben aktiválják is őket. Az effektor kaspázokhoz tartozik a kaspáz-3, -6, -7, melyek más fehérje szubsztrátokat hasítanak az apoptikus folyamatok beindításához.

A mitokondriális út esetén az apoptikus fehérjék a sejtmembrán pórusok formálásával a mitokondrium duzzadását idézik elő vagy a mitokondrium

permeabilitását növelik, ami az apoptotikus effektorok kiszivároztatásához vezet. A megnövekedett permeabilitás következtében SMAC-ok (Second Mitochondria-Derived Activator Caspases) szabadulnak fel és kerülnek be a citoplazmába. A SMAC-ok az IAP-okhoz (Inhibitor of Apoptosis Proteins) kötődnek és deaktiválják azokat. Az apoptikus folyamat során a mitokondriumból citokróm c szabadul fel és az APAF-1-hez (Apoptotic Protease Activating Factor-1) és a pro-kaspáz-9-hez kötődik, kialakítva az apoptozómának nevezett fehérje komplexet. Ebben az esetben a kaspáz-9 aktiválódik, ami aktiválja az effektor kaspáz-3-at. Az apoptózis folyamata számos spermamorfológiai tulajdonsággal jellemezhető. A kaspáz kaszkád aktivizálódásának hatására a sejtmembrán elveszíti egybefüggőségét, asszimetriáját, a citoszol és a sejtmag összezsugorodik, a DNS-ben fragmentáció történik (6. ábra) (RUWANPURA és mtsai, 2010).

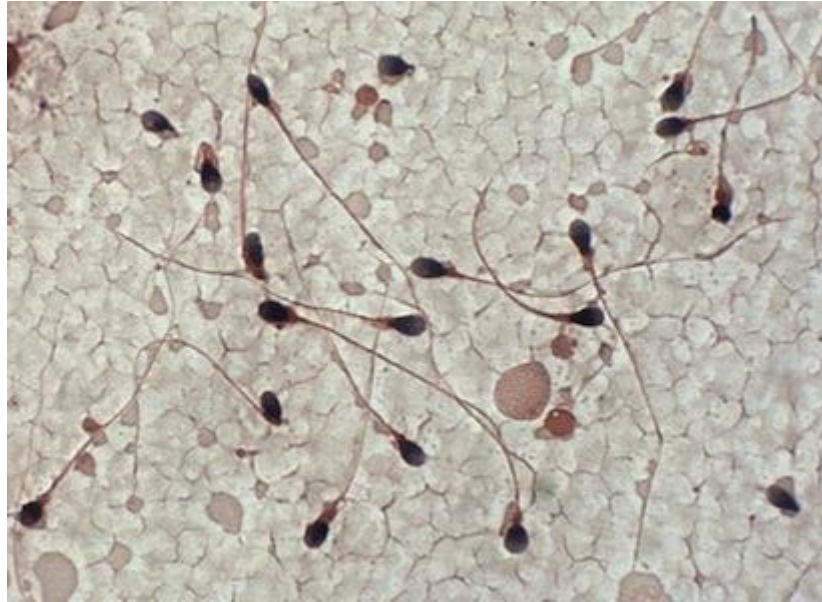


6. ábra: Az apoptózis intrinsic és extrinsic útvonala

(Forrás: KERR és mtsai, 1972)

Az apoptikus sejtek azonosítását ma már számos módszer segítségével el lehet végezni, mint a TUNEL-teszt (terminal deoxynucleotide transferase-mediated deoxyuridine triphosphate nick end-labeling). Az apoptózis ultrastukturális tulajdonságai elektronmikroszkóppal vagy flow-citométerrel jeleníthetők meg.

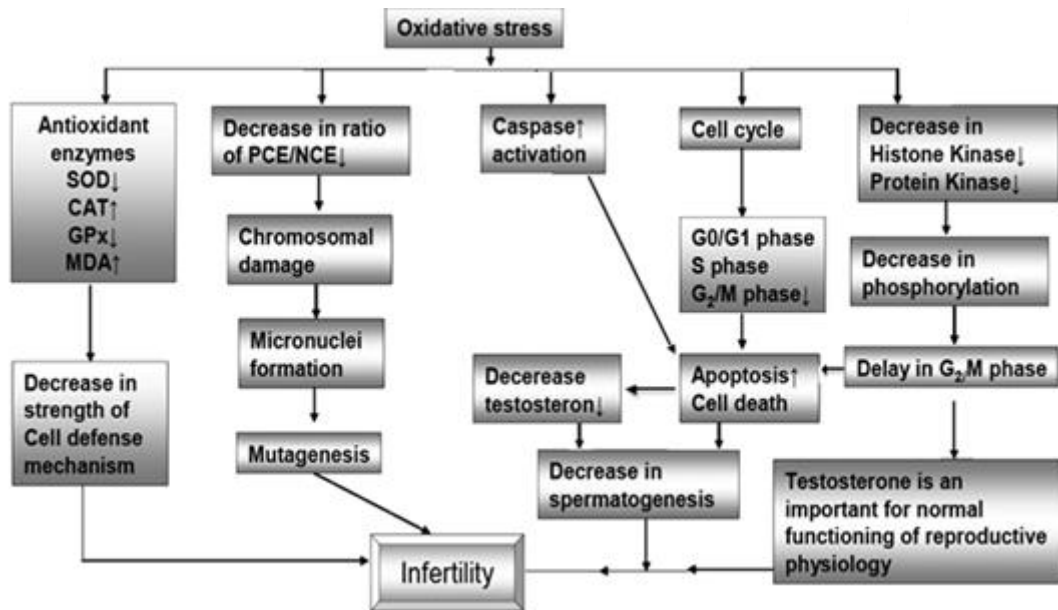
A jövőben az apoptózis effektor molekuláinak aktivációjának kimutatása immunokémiai módszerekkel is lehetségessé válik (kaspáz neoepitopok) (RUST és mtsai, 2000). A TUNEL-teszt mellett az apoptózis detektálására alkalmas a hematoxilin-eozin festékkombináció alkalmazása is (AKSOY és mtsai, 2012; ELMORE, 2007) (7. ábra).



7. ábra: Hematoxilin-eozinnal festett spermiumok
(Forrás: INTERNET 1)

2.5 Az oxidatív stressz hatása a spermasejtekre

Az oxidatív stresszre jellemző, hogy a szervezetben a RONS (Reactive Oxygen and Nitrogen Species) szabad gyökök képződnek nagy mennyiségben (SIKKA és mtsai, 1995). A szabad gyökök olyan molekulaszármazékok, amelyek egy vagy több párosítatlan elektront tartalmaznak, ezáltal képesek a sejtmembránt alkotó fehérjéket, lipideket, aminosavakat oxidálni. A reaktív oxigén intermedierek (ROS) oxidatív stresszt okozva megbontják a sejtek pro- és antioxidáns egyensúlyát, növelve a sejtek membránsérülését (8. ábra). A ROS egy gyűjtő fogalom, amely nem csak a szabad gyököket (pl.: hidroxil ion, szuperoxid, nitrogén monoxid, peroxil), hanem a hidrogén peroxidot, szinglet oxigént is magába foglalja, amelyek nem rendelkeznek párosítatlan elektronnal, mégis reaktívak, képesek kapcsolatba lépni más molekulákkal (AGARWAL és PRABAKARAN, 2005).



8. ábra: Az oxidatív stressz hatása a spermasejtekre

(Forrás: AGARWAL és mtsai, 2011)

A nitrogén eredetű szabadgyökök, mint a nitrogén monoxid, peroxinitrit, alkilperoxinitritek a ROS egyik alcsoportjába sorolható vegyületek, melyek szintén jelentős membránkárosító hatással rendelkeznek (SIKKA, 2001; DARLEY-USMAR és mtsai, 1995). A szervezetben megtalálható enzimatis (glutation-peroxidáz, szuperoxid-dizmutáz, kataláz) és nem enzimatis (aszcorbinsav, tokoferol, flavonoidok) antioxidánsok képesek a szabadgyökökhöz kapcsolódni, semlegesíteni azokat és így védik meg a szervezet sejtjeit a szabad gyökök káros hatásaitól (SIES, 1997). Amennyiben az egyensúly felborul és megindul a szabadgyökök túltermelődése vagy az antioxidánsok szintje csökken, úgy oxidatív/nitrozatív stressz alakul ki, melynek hatására csökken a sperma fertilizációs képessége (CABISCOL és mtsai, 2000).

A szabadgyökök elsősorban a spermium membránját alkotó lipideket, fehérjéket, aminosavakat roncsolják, de a DNS szerkezetét is képesek megbontani (GHARGOZLOO és AITKEN, 2011; AGARWAL és mtsai, 2008; OCHSENDORF, 1999). A spermamembrán szerkezetének károsodása következtében sérül a középrészben található mitokondrium, ami a sejt energiaellátásáért felelős és egyben az egyik fő ROS forrás is (AITKEN és mtsai, 2012; BUCAK és mtsai, 2008). A szabadgyökök túl magas koncentrációja károsítja a spermiogenezist, és megnö az éretlen, plazmacseppes sejtek száma az ejakulátumban (SANOCKA és KURPISZ, 2004). Hímivarban a reaktív oxigén intermedierek a sperma anyagcseretermékeként is

kialakulhatnak abban az esetben, ha a spermamembrán felszínén megnő a NADH oxidáz enzim aktivitása a NADH oxidoreduktázzal szemben (GAVELLA és LIPOVAC, 1992).

Bikasperma ROS koncentrációja egyenes arányban nő az ondóban lévő elhalt sejtek számával. Az apoptózis és a nekrozis egyaránt nukleinsav oxidációval jár, ami szabadgyökök kialakulásához vezet (SARIÖZKAN és mtsai, 2009). Az előbb említett élettani folyamatok mellett emelkedett ROS szintet eredményez a megnövekedett leukocitaszám és az éretlen spermiumok számának túlsúlya az ondóban (GARRIDO és mtsai, 2004). A reaktív oxigén intermedierek szintje ritkán ingadozik a termékeny hím állatoknál, ebből adódóan nincs hatással a sperma koncentrációjára, motilitására. Ez annak köszönhető, hogy egészséges szervezetben az antioxidáns védelmi rendszer is megfelelően működik. A ROS szintjének ingadozását elsősorban a spermatogenezisben bekövetkezett zavar (plazmacseppesség, degradált sejtek) vagy szubklinikai fertőzés idézi elő, mely szabad szemmel nem észlelhető (DESAI és mtsai, 2010). A szabadgyököknek összetett élettani hatása van, mivel nem csak egy élettani folyamat lejátsszódását befolyásolják. A ROS és antioxidánsok közötti arány, hatással van az ivarsejtek képződésének folyamatára (GAGNON és mtsai, 1991; AITKEN, 1997; ATTARAN és mtsai, 2000), a kapacitáció beindulására (DE LAMIRANDE és mtsai, 1997) és az embrió implantációjának, fejlődésének sikerességére (SAKKAS és mtsai, 1998).

A reaktív oxigén intermediereknek abban az esetben rendelkeznek spermakárosító hatással, ha koncentrációjuk meghaladja az antioxidáns kapacitást. Amennyiben egyensúly van a két rendszer között, úgy a ROS fontos szerepet tölt be a spermasejtek normális működésében. A kapacitáció, akroszómareakció lejátsszódásában, a középészben lévő mitokondrium kiegyenlített működésében kiemelt szerepe van ezeknek a vegyületeknek (AGARWAL és mtsai, 2008; GONÇALVES és mtsai, 2010; DESAI és mtsai, 2009). A spermium végső érésének szakasza a női nemi traktusban a kapacitáció, hiperaktiváció, melyek lejátsszódása esszenciális ahhoz, hogy az ondósejt termékenyítőképesé váljon. A két folyamat lejátsszódásának fő katalizátora a ROS koncentrációjának változása (DE LAMIRANDE és GAGNON, 1993). A fiziológias ROS koncentráció az akroszómareakció beindítása mellett a spermamembrán fluiditását is növeli, ezzel lehetővé téve a peteburok bontásáért felelős enzimek kiszabadulását (BUCAK és mtsai, 2007; BUCAK és mtsai, 2010). Az emlős spermiumok membránja

nagy arányban tartalmaz telítetlen zsírsavakat, emiatt rendkívül érzékeny a reaktív oxigén gyökök által kiváltott lipidperoxidációra, valamint a reaktív oxigén intermedierek által okozott támadásra, melynek hatására csökken a motilitás. Ennek oka, hogy az oxidatív reakció hatására károsodik mitokondrium szerkezete és a sejt hirtelen felhasználja ATP készleteit (SIKKA, 1995; BANSAL és BILASPURI, 2007).

2.6 Kosok termékenyítőképességét meghatározó tényezők

2.6.1 Fajta

A generációnkénti genetikai előrehaladás intenzitásának növelésének egyik lehetséges módja, hogy csak a legjobb tenyésztéssel rendelkező apaállatokat vonjuk be a tenyésztési vagy mesterséges termékenyítési programba. Egy-egy tulajdonság javítása (pl. hústermelő-képesség, tejtermelő-képesség) nem csak az anyai vonalak szelektálásával valósulhat meg, hanem a hímek tudatos, célirányos szelekciójával is (ABDEL-RAHMAN és mtsai, 2000). A szarvasmarha ágazatban, az 1970-es években a bikákat nem csak saját és ivadékteljesítményük alapján szelektálták, hanem spermájuk minősége, fagyasztásra való alkalmassága szerint is. Mesterséges termékenyítési programban csak azok az egyedek vehettek részt, melyek spermája alkalmas volt a tárolásra, fagyasztásra. Ennek eredményeképpen napjainkra csak azok a vonalak maradtak fenn, melyek alapító bikái a legjobb spermaminőséggel rendelkeztek. A legtöbb juhajtánál a fentebb említett szelekció a mai napig nem ment végbe, ezért jelentős a különbség az egyes fajták kosainak reprodukciós teljesítménye között (PÉCSI, 2007). Az 1960-as évektől végzett kísérletek igazolják, hogy különbség tapasztalható különböző fajtájú kosok tesztoszteronszintjében (BOLAND és mtsai, 1985), spermiumok motilitásában (KASIMANICKAM és mtsai, 2007), ondó koncentrációjában (MANDIKI és mtsai, 1998) és a sperma fagyaszthatóságában (COURNOCK és mtsai, 1984).

Dél-Afrikában az 1930-as években megfogalmazódott az igény egy új hústípusú juhajtánál kitenyésztésére, amely képes alkalmazkodni az aszályos időjárási körülményekhez, de emellett kiváló hústermelő képességgel is rendelkezik. A tenyészcélnak a szomáli x dorset horn keresztezés felelt meg leginkább, amit 1947-ben dorper néven törzskönyveztek (LATEGAN, 2004). Kültakarójának színe a törzsön és a lábakon fehér, szürkés-fehér, feje és a nyak felső része fekete, de előfordulhat foltos

vagy teljesen fehér színváltozat is. A fajta kitűnő húsformával rendelkezik (különösen a hátsó combok izmoltsága jó), erős csontozatú. A jerek korán érők, már 8 hónapos korban tenyésztésbe vehetők. Az anyajuhokra jellemző a 140-150%-os szaporaság, ami kiváló báránynevelő-képességgel párosul (MILNE, 2000; KOVÁCS és mtsai, 2008). Az 1950-es években W. Colerous fajtatizta merinó juhállományát fehér színű dorper kosokkal keresztezte át és csak azokat az egyedeket tenyésztette tovább, amelyek fehér kültakaróval rendelkeztek. Későbbi a fehér színre és jó hústermelő képességre szelektált állományt van-rooy fajttal nemesítették tovább, majd 1964-ben fehér dorper néven törzskönyvezték (NEL, 1993). Napjainkban a két színváltozathoz több mint 10 millió juhot tartanak Dél-Afrikában, de Ausztrália, Kanada, Nagy-Britannia és a Közel-Kelet is több milliós létszámú állománnyal rendelkezik (MILNE, 2000). A dorper 2008-ban került Magyarországra, ezért a hazai szakirodalomban jelenleg kevés információ áll rendelkezésre a fajta reprodukciós mutatóiról, akklimatizációs képességéről (OLÁH és mtsai, 2008; OLÁH, 2010; GYIMÓTHY, 2011; BUDAI és mtsai, 2012) és a külföldi tanulmányok többsége is csak érintőlegesen tárgyalja a kosok akklimatizációs képességét, spermatermelését. OLÁH (2010) azt vizsgálta, hogy különböző évszakokban van-e eltérés awassi, barbados blackbelly, dorper, bábolna tetra, cigája, ile de france, suffolk, szapora merinó fajtájú kosok ondójának minőségében. A szerző munkája során megállapította, hogy a kos ondó mélyhűtésének optimális időpontja hazánkban fajtaspecifikus.

2.6.2 Szezonális és klimatikus hatások

Ugyan a szezonális hatása elsősorban az anyajuhokra jellemző, de kontinentális éghajlaton az évszakok változása a kosok spermatermelését, spermaminőségét is befolyásolja. Mérsékelt égövön a merinó kosok augusztustól decemberig terjedő időszakban termelik a legtöbb spermát, késő tavasszal és kora nyáron kevésbé hajlamosak a párzásra (CZAKÓ, 1978; EVANS és MAXWELL, 1987). VAHID és KÓBORI (2002) szerint leginkább azért van eltérés a nyájak ivari működése között, mert azt klimatikus tényezők módosítják, még nagyjából stabil tartási, takarmányozási körülmények mellett is.

A kosok luteinizáló hormon (LH) szintje évszakszerű változást mutat, melynek mennyisége februártól júniusig nő, szeptembertől decemberig csökken, mely epizodikus tesztoszteron szekréció növekedését idézi elő. A csökkenő nappali megvilágítás fokozza

a spermatogenezist, növeli a tesztoszteronszintet, ami a megváltozott vérmennyiséggel együtt a here tömegének növekedését eredményezi, ezért már június-júliusban a tenyésztés előtt elkezdődhet a herék növekedése (ALLER és mtsai, 2012). A tavaszi időszak kezdetével, ahogy fokozódik a nappali megvilágítás, úgy csökken a here tömege és a spermatogenezis intenzitása. COLAS és COUROT (1977) összefüggést igazolt az abnormális sejtek száma és a fotoperiódus között. Ősszel, amikor a nappali világítás hossza fokozatosan csökkent, a morfológiailag deformált sejtek száma Ile de France kosoknál fele akkora volt ($10,3 \pm 7,7\%$), mint tavasszal ($22,1 \pm 15,9\%$). Ile de France fajtánál ősszel, Suffolk fajtánál télen, Szapora Merinó fajtánál tavasszal van az ondó mélyhűtésének optimális időpontja, mert ebben az időszakban a legmagasabb a felolvasztást követő élősejtszám az ondóban. KARAGIANNIDIS és mtsai (2000) Chios és Kelet-fríz fajtájú juhok ondóját vizsgálták különböző évszakokban. Mindkét fajta esetében az őszi időszakban volt a legjobb a sperma minősége. Chios kosoknál tavasszal az átlagos spermamennyiség 1,24 mL, fríznél 1,0 mL, ezzel szemben ősszel 1,47 mL Chios és 1,48 mL fríz kosok esetében. A motilitás mellett a morfológiai rendellenességgel rendelkező sejtek száma tavasszal volt több (Chios: 8,22%, Kelet-fríz: 7,75%) az őszi tenyészszезонhoz viszonyítva. A legszembetűnőbb különbség a tavaszi és őszi időszak között a spermakonzentrációban mutatkozott meg. Mindkét fajta esetében közel kétszerese volt az őszi spermakonzentráció (Chios: $7,05 \times 10^9$) a tavaszi időszakhoz képest ($4,09 \times 10^9$).

ALESSANDRO és MARTEMUCCI (2003) azt vizsgálták, hogyan alakul a különböző évszakokban fagyasztott kos sperma viabilitása, akroszóma membrán integritása a termékenyítőanyag felolvasztását követően. Eredményeik azt igazolják, hogy a nyár végén, kora ősszel fagyasztott spermaminták életképessége volt a legkedvezőbb (41,7%). Az ebben az időszakban fagyasztott minták esetében volt a legkisebb az akroszóma leválás mértéke a felolvasztott mintákban. Kosok spermatermelését a nappalok hosszúsága mellett jelentősen befolyásolja a környezet hőmérséklete, annak ingadozása. Tartósan 36°C feletti hőmérséklet a kosok spermatermelését hátrányosan befolyásolja, míg az őszi és téli alacsonyabb hőmérséklet kedvezően hat a spermaminőségre. A herék természetes hűtésének zavara, amely legjellemzőbben nyáron alakul ki, negatív hatással van az ejakulátum térfogatára, sűrűségére, spermiumszámra, motilitására, mindemellett az ondóban is megszorodik a deformált sejtek száma (MARAI és mtsai, 2007; SARLÓS, 1996).

OLÁH és mtsai (2008) az ondó minősége és a környezeti hőmérséklet összefüggéseit vizsgálták dorper fajtájú tenyészkosoknál. Az ondó vizsgálata során nagy eltéréseket tapasztaltak egy-egy jellemző tulajdonság vonatkozásban. A kosok ejakulátumában az élősejt % értékek közötti kezdeti különbségek (40-80%) az átlaghőmérséklet emelkedésével mérséklődtek és az élősejtszám 60-65%-nál állapodott meg, 19,8°C átlaghőmérséklet fölött minden vizsgált egyed esetében. Az ondó minősége drasztikusan csökken abban az esetben, ha a here felületének hőmérséklete tartósan meghaladja a 35°C-ot. Ennek ellensúlyozására a nyári melegben érdemes melatonin és B1, B6, B12 vitaminok kombinációját alkalmazni, melynek hatására nő a libidó és javul a spermaminőség (EL-DARAWANY, 1999).

A fotoperiódus hatással van a kosok herekörméretének változására is. Ősszel, csökkenő megvilágítás hatására nő a herekörméret, majd ahogy nő a megvilágítás hossza, úgy csökken a herekörméret is. Az őszi és tavaszi időszakban mért értékek között akár 2-3 cm-es különbség is lehet (HORVÁTH, 1983, GERGÁTZ, 2007). Az elmúlt évtizedekben több hazai és nemzetközi tanulmány foglalkozott a fotoperiódus spermatermelésre gyakorolt hatásával. Texel, suffolk, ile de france (MANDIKI és mtsai, 1998), chios és kelet-fríz (KARAGIANNIDIS és mtsai, 2000) és karakul (KAFI és mtsai, 2004) kosoknál megállapították, hogy a szezon hatással van a reprodukciós mutatók alakulására. A hazai szakirodalomban magyar merinó (PÓTI és mtsai, 1998), brit tejelő (SARLÓS és MOLNÁR, 1995), awassi, barbados blackbelly, cigája, ile de france, suffolk, szapora merinó (OLÁH, 2010) és hortobágyi racka kosok (EGERSZEGI és mtsai, 2011) szezonálisát vizsgáló forrásmunkák találhatók meg.

2.6.3 Takarmányozás

A spermiumok termelődése az ivarérettől kezdve folyamatos. A spermatermelés mégsem növeli számottevően a hímek energia- és fehérjeszükségletét. A hazai ajánlás a kosok fehérjeadagját a fedeztetési idény alatt 55%-kal javasolja növelni a fedeztetési idényen kívüli időszakhoz viszonyítva (SCMIDT, 2003). VAHID és KÓBORI (2002) szerint a fehérjebevitel hatással van a spermatermelésre, részben az endokrin mirigyek befolyása következtében, részben azért, mert az ondónak nagy a fehérjetartalma. A korlátozott energia-felvételhez csökkent vérátfolyás, oxigén-és glükóz felvétel társul, ami negatívan hat a spermioenezisre. A hosszan tartó hiányos takarmányozás miatt

kialakult spermaminőségromlást a takarmányozási szint emelkedésével helyre lehet hozni. Éppen ezért, ha a kosok a tenyésztés kezdete előtt 2 hónappal gyenge kondícióban vannak, kiegészítő takarmányozással a fedeztetés kezdetére megjavítható az ivari tevékenységük. A spermiumok fejlődésére és mennyiségére hatással vannak a különböző vitaminok, ásványi anyagok. VAHID és KÓBORI (2002) szerint az ásványi anyagok közül a foszfor, vas, réz, kobalt, szelén, mangán, cink hiánya befolyásolhatja a kosok spermatermelését a legnagyobb mértékben. Foszforhiány akkor lép fel, ha kiszáradt legelőkön tartják a kosokat. Pótlása szemes takarmányokkal, korpával és különböző foszforkészítményekkel oldható meg. A cink a spermatermelés szempontjából a legmeghatározóbb ásványi anyag, hiánya esetén nagymértékben károsodik a spermatogenezis. A vérben megemelkedett tesztoszteronszint a cinkfelvételt serkenti, amely a kanyarulatot herecsatornák csírasejtjeinek normális működéséhez elengedhetetlen. A cinkhiány egyik legjobb indikátora a herékörméret fokozatos csökkenése.

Szelénhiány esetén gyengülhet a spermiumok motilitása és sok ondósejt a közepérszél eltörik, csökken a fogamzási arány, de nagyfokú szelénhiány akár blokkolt ejakulációhoz is vezethet (UNDERWOOD és SUTTLE, 1999). Az ondóplazmában található szelénkoncentráció hatással van a peroxidáz enzim működésére is, mely a szabadgyökök semlegesítéséért felelős. Amennyiben csökken az ondóplazma szeléntartalma, úgy csökken a peroxidáz enzim aktivitása is, amely fokozott membránkárosodáshoz vezethet (IRVINE, 1996). A kérődzőknek átlagosan napi 0,1-0,3 ppm mennyiségű szelénbevitelre van szüksége. Mivel a világon a legtöbb talaj szelénben szegény, ezért a legelőfű vagy a széna szeléntartalma is alacsony és a bennük található szeléntartalom nem fedezi a kérődzők napi szükségletét. Magyarországon többek között ez az oka annak, hogy a juhok szelén nyalósót kapnak (JÁVOR és mtsai, 2006).

2.7 A hűtés hatása a spermiumokra

Mesterséges termékenyítés esetén a juhtenyésztésben leginkább a helyben termelt spermával történő termékenyítést alkalmazzák a tenyésztők. A világban a központi spermatermelő állomások létrehozásával a javító hatású, jó spermaminőséggel rendelkező kosok egy helyre kerültek és a sperma szállításának és termékenyítőképeségének hosszabb ideig történő megőrzése egy megoldandó feladattá

vált. A hígított sperma +15°C-ra hűtésével a termékenyítőanyag 10-12 óráig használható fel és akár 200-300 km-re történő szállítást követően is alkalmas termékenyítésre. A mesterséges termékenyítéshez felhasznált sperma 24-48 óráig való megőrzése 0-5°C-on végzett folyékony konzerválással oldható meg. Magyarországon az elmúlt évtizedekben a mesterséges termékenyítő állomások és nagyüzemek is próbálkoztak a módszer alkalmazásával. A fogamzási eredmények az első inszeminálás alkalmával 50% körüliek voltak, de volt olyan állomás, ahol a gyenge fogamzási eredmények miatt felhagytak a módszer alkalmazásával (HORVÁTH és mtsai, 1982). VISSER és SALAMON (1974) hangsúlyozta, hogy a 18°C-ról 2-5°C-ra történő hűtést óvatosan és folyamatosan kell végezni és a tárolás során el kell kerülni a hőmérsékletingadozást. Az ondó különböző hígítók hozzáadásával hosszabb ideig eltartható és mesterséges termékenyítés során friss vagy mélyhűtött formában is felhasználható (SZENCI, 1984). A hígítás mértékét elsősorban a sperma koncentrációja, az előrehaladó mozgást végző, valamint a rendellenes alakú spermiumok százalékos aránya befolyásolja. A hígítás mértéke legtöbb esetben 1:1-4-ig terjed. Amennyiben a hígítás ennél nagyobb mértékű, akkor a sperma már sokat veszít termékenyítőképességéből (JÁVOR és mtsai, 2006).

KÖLLIKER (1856) már igen hamar felismerte, hogy ha spermát vízzel hígítjuk, akkor annak farka feltekeredik. Ennek az a magyarázata, hogy a spermium membránja szemipermeábilis hártvaként működik, így az ozmotikus kiegyenlítődés érdekében víz jut a sejtekbe. Mivel a spermiumok feje kompakt, a vízfelvétel okozta duzzadás a farki rész feltekeredésén látható. A legtöbb hígító izotóniás vagy hipertóniás a szeminális plazmához képest. A hígítóban az ozmotikus viszonyokat a hozzáadott cukor mennyiségével lehet szabályozni. Az ozmotikus nyomást és a pH értékét lehetőség szerint úgy kell beállítani, hogy a lehető legnagyobb mértékben közelítse meg a szeminális plazmában mérhető normálértékeket (EINARSSON és mtsai, 1973).

A kosondó hűtéshez használt hígítóknak tartalmaznia kell a spermiumok anyagcseréjéhez fontos energiaforrást, megfelelő pufferkapacitással kell rendelkezni, hogy kiküszöbölje a hűtés során végbemenő pH változást. Leggyakrabban tojássárgáját adnak a hígítóhoz, hogy a spermium membránja a hűtés során ne károsodjon (EVANS és MAXWELL, 1987). A kossperma hűtéséhez használt hígítókat kialakulásuk időbeli sorrendje szerint 7 csoportra lehet osztani, úgymint citrát-cukor alapú, tej alapú, laktóz alapú, szaharóz alapú, raffinóz alapú, Tris-alapú, egyéb hígítók (SALAMON és MAXWELL, 2000). Az egyik legrégebben alkalmazott spermahígító

alapanyaga a tehéntej (BLACKSHAW, 1960). SALAMON és MAXWELL (2000) UHT (ultramagas hőmérsékleten kezelt tej) tej alapú hígító előnyének tarja, hogy hígítás előtt nem kell forralni és azonnal felhasználható, valamint steril tápközeget biztosít a spermiumok számára. OLIVERA-MUZANTE és mtsai (2011) azt vizsgálták, hogy +5°C-on 24 és 48 órán át tárolt tej alapú hígítóval (UHT tej+5%; tojássárgája+2% glicerin) vagy szintetikus hígítóval (INRA-96®+5%; tojássárgája+2% glicerin) érhetőek el kedvezőbb vemhesülési eredmények. A vizsgálat során a termékenyítésben 1198 merinó anya vett részt. A termékenyítéstől számított 40. napon ultrahangos vemhességvizsgálatot végeztek. A vemhesülési eredmények között nem volt szignifikáns különbség (49% és 47%; $P>0,05$), amiből arra következtettek, hogy tej alapú hígító is alkalmas kosondó hígítására, mesterséges termékenyítésre.

2.8 Antioxidánsok

Az emberi és állati szervezetben egy effektív rendszer alakult ki, amely védelmet biztosít a szabadgyökök káros hatása ellen. Ez a rendszer az antioxidáns védelem. Antioxidáns bármely vegyület, molekula, enzim, melynek jelenléte késlelteti vagy meggátolja a szubsztrát oxidációját. Az antioxidánsok a sejtek védelmét a szabadgyökök közvetlen hatástalanításával, az oxidatív láncreakció megszakításával vagy a már károsodott molekulák javításával biztosítják (SIES, 1997). A spermiumokat az oxidatív stressz káros hatásától a szeménális plazmában található antioxidánsok és enzimek védik meg (KIM és PARTHASARATHY, 1998). Mivel az antioxidánsok képesek az oxidatív folyamatok károsító hatását csökkenteni, ezért az ondósejtek motilitásának, membránintegritásának és fertilitásának megőrzésében elsősorban az antioxidánsok töltenek be fontos szerepet (BANSAL és BILASPURI, 2008). A kataláz, szuperoxid dismutáz, glutation peroxidáz az intracelluláris antioxidáns védelmet biztosító enzimek, míg az aszkorbinsav, tokoferol az extracelluláris térben biztosítják a prooxidáns és antioxidáns vegyületek közötti egyensúlyt.

Oxidatív stressz akkor alakul ki, amennyiben a két rendszer között felborul az egyensúly. Az E-vitamin (tokoferol) a sejt membránban is megtalálható, mely elsősorban a lipidperoxidáció során keletkezett peroxil és alkil gyököket semlegesíti (BANSAL és BILASPURI, 2009). A Mn^{2+} az oxidatív stressz negatív hatását csökkenti, ezáltal fokozza a sejtek motilitását és semlegesíti az akroszómareakciót, kapacitációt felgyorsító szabadgyököket (BANSAL és BILASPURI, 2008). Amennyiben túl magas az extracelluláris Mn^{2+} koncentráció, úgy megnő a cAMP szintje, ami a sejt kalcium

csatornáinak megnyílását idézi elő, ami fokozott Ca^{2+} beáramlást eredményez. Ennek egyik negatív hatása, hogy a megnövekedett Ca^{2+} tartalom akroszómareakciót vált ki a sejteknél (KIM és PARTHASARATHY, 1998). Az előbbi példa is szemléletesen mutatja, hogy amennyiben az antioxidáns hatású vegyületek túl magas koncentrációban vannak jelen az extracelluláris térben, az negatívan befolyásolja a spermasejtek életfolyamatait. A korábbi kutatási eredmények megerősítik azt a tényt, hogy a hűtés és fagyasztás során alkalmazott antioxidáns vegyületek segítenek kivédeni a hidegsokk hatását. Kos, bika, bak, kan és ménsperma esetében is bizonyításra került, hogy azon felolvasztott minták motilitása, membránintegritása volt kedvezőbb, melyek antioxidáns kiegészítésben részesültek (BUCAK és mtsai, 2010). Az *in vitro* fertilizációhoz használt termékenyítőanyag antioxidáns vegyületekkel való kiegészítése szintén ajánlott, mivel képesek megvédeni a sperma DNS-t a károsodástól, ezért csökkentik az esélyét az esetleges embrióelhalásnak, malformációknak, melyek a sperma DNS-ének károsodásából eredhetnek (GONCALVES és mtsai, 2010).

2.8.1 Az antioxidáns enzimek

Az intracelluláris sejtvédelmet elsősorban az enzimatisz antioxidánsok biztosítják, melyek a reaktív oxigén gyökök lebomlását katalizálják. Ebben három fő enzim a szuperoxid-dizmutáz, glutation peroxidáz, kataláz és a glutation reduktáz vesz részt (AGARWAL és PRABAKARAN 2005). A szuperoxid-dizmutáz a szuperoxid aniont bontja, melynek során peroxid és oxigén keletkezik. Az enzimnek több fajtája is ismeretes, melyeknek centrumában egy átmeneti fémion található, pl. Mn^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} . Az enzim a spermasejteket elsősorban a lipidperoxidációtól védi meg (SIKKA és mtsai, 1995). A glutation peroxidáz egy szelenoprotein, melynek katalitikus centrumában egy szelenocisztein található. Emiatt az *in vitro* és *in vivo* szelénhiány is enzimdefektushoz vezethet. Az enzim a H_2O_2 , lipid és nem lipid hiperoxidok semlegesítésében vesz részt. Kos és bikasperma esetében a kataláz enzim biztosítja a leghatékonyabb védelmet a H_2O_2 okozta membránsérülések ellen (BUCAK és mtsai, 2007).

2.8.2 Nem enzimatisz védelmi rendszer

A spermasejtek védelmében számos nem-enzim molekula is részt vesz. Bár ezeknek a vegyületeknek nem az elsődleges feladata a szabadgyökök semlegesítése, de a szervezetben lévő magas koncentrációjuk miatt jelentős részét képezik az

antioxidáns védelmi rendszernek. Ilyen vegyületek a C-vitamin, E-vitamin, cisztein, taurin, glutamin, curcumin, szelén (AGARWAL és mtsai, 2008). A C-vitamin (aszorbinsav) erősen redukáló hatású vegyület, mely az oxidációs-redukációs folyamatokban vesz részt, mint hidrogén donor. Erős redukáló anyag, melynek fontos szerepe van a tetrahidrofolát oxidáció és a peroxilgyökök elleni védelemben. Az aszorbinsav vizes oldatokban képes a szuperoxid anion, peroxilgyökök, valamint a szinglet oxigén semlegesítésére, emellett a nitroxid és hidroxil gyököket is megköti. Oxidatív stressz hatására mennyisége csökken és dehidroaszorbinsavvá redukálódik (HALLIWELL, 1994). Az E-vitamin (tokoferol) zsírban oldódó, könnyen oxidálódó vegyület, melyek megakadályozzák a többszörösen telítetlen zsírsavak oxidációját. A sejtmembránok károsodás elleni védelmében kulcsszerepet játszik, segít megelőzni a DNS károsodását és védi a sejtek zsírban gazdag alkotórészeit. Az alfa-tokoferol a lipidperoxidáció során a lipidperoxil gyökökkel reagálva egy stabil lipid hidroperoxid gyököt alakít ki, ami tokoferil gyökké oxidálódik, és ezzel megszakítja a gyökreakciót (BEHRENS és mtsai, 1982).

A felolvasztott kos spermiumok motilitását, membránintegritását és a kataláz enzim aktivitását is pozitívan befolyásolta a hígítóhoz adott glutamin (5mM) kiegészítés (BUCAK és mtsai, 2009). A cisztein egy α -aminosav, mely tiol oldallánccal rendelkezik, emiatt redoxireakciókban könnyen részt vesz, ezáltal semlegesítve a szabadgyököket. A cisztein egyben a glutation prekuzora (UYSAL és BUCAK, 2007). Mivel kis molekulású aminosav, ezért könnyen átjut a sejtmembránon keresztül és serkenti a glutation bioszintézist, valamint védi a sejtmembrán lipidjeit és fehérjeit (HENDIN és mtsai, 1999). A cisztein antioxidáns hatását spermasejteknél is igazolták. Fagyasztott kos és bikaspermiumok motilitása és membránintegritása is kedvezőbb volt, amikor a szintetikus hígító ciszteint is tartalmazott (UYSAL és BUCAK, 2007).

A trehalóz és a taurin aerob körülmények között védi a spermasejteket a reaktív oxigén gyökök okozta káros hatástól, melyek a hűtési/fagyasztási folyamat során szabadulnak fel nagy mennyiségben (REDDY és mtsai, 2010). A trehalóz egy diszaharid, mely képes a spermamembránban a vizet pótolni és megakadályozni, hogy a hűtési folyamat során a spermamembrán jelentős mértékben károsodjon (BUCAK és mtsai, 2007). A taurin egy nem-fehérjeépítő aminosav, mely szerepet játszik a membránon keresztüli kalcium áramlás szabályozásában, elősegíti a glükóz sejtekbe áramlását, és növeli a kataláz és szuperoxid dizmutáz enzimaktivitását a kos, nyúl és bika ondóplazmájában (REDDY és mtsai, 2010). SARLÓS és mtsai (2002)

közleményükben arról számoltak be, hogy a rezveratrol és Aromex kombinációja pozitívan befolyásolta a spermiumok motilitását a +5°C-os hűtve tárolás során.

2.9 Zselatinok

A spermiumok konzerválásához felhasznált hígító összetétele döntően befolyásolja a motilis, akroszómával rendelkező sejtek számát. MILOVANOV (1937) volt az első, aki zselatint használt kos sperma hígításához és hűtve tárolásához. Hipotézise szerint a zselatin alkalmazásával könnyebben injektálható a sperma a cervixbe a visszafolyás veszélye nélkül. A vizsgálatai alapján a zselatinnal végzett termékenyítések eredményesek voltak, de 6h-ás tárolást követően felhasznált spermánál csökkentek a termékenyülési eredmények annak ellenére, hogy 36h-ás tárolást követően is magas volt a motilis sejtek aránya. TASSERON és mtsai (1977) azt vizsgálták, hogy a mélyhűtés milyen hatást gyakorol a kos spermiumok akroszómájára. A mélyhűtött termékenyítőanyag felolvasztását követően az akroszóma állapotát elektronmikroszkóp segítségével vizsgálták meg, melynek során azt az eredményt kapták, hogy a spermiumok több mint 50%-a vesztette el akroszómáját. Az elmúlt évtizedek során több kutatás foglalkozott ennek a problémának a kiküszöbölésével. Az egyik lehetséges megoldás a zselatin tartamú hígító használata lehet, ami az eddigi kutatások során eredményesnek bizonyult.

YÁNIZ és mtsai (2005) kossperma hígításához szintén zselatin tartalmú hígítót használtak, kontrollként tej alapú hígítót. A termékenyítőanyagot 2, 24, 48h tárolták +15°C-on, majd a minták értékelését követően azt az eredményt kapták, hogy 24 és 48h tárolás után a zselatin tartalmú hígítóban volt magasabb a motilis sejtek aránya. A 24h tárolt spermát in vitro fertilizációra használták fel, majd inkubációt követően a petesejteken penetráció nyomát keresték. Az eredmények azt igazolták, hogy a zselatinos hígítóban tárolt hímivarsejtek nagyobb arányban termékenyítették meg a petesejteket. HUANG és mtsai (2005) szerint meghosszabbítható a bikaspermiumok életképessége fagyasztás során, ha alginát tartalmú mikro-kapszulákban történik a fagyasztás. SZELE (2006) leírta, hogy hazánkban a nyúlondó mélyhűtésével kapcsolatban, olyan kísérletek folynak, ahol zselatinos tartósítással próbálják csökkenteni az ondósejtek károsodásának kockázatát. A zselatinos tartósítás során a hígított ondót - mélyhűtés nélkül- szobahőmérsékleten, vagy 5°C-ra hűtve 24 órán belül, esetleg még a következő napon is fel lehet használni. Az eljárás előnye, hogy az 5°C-on

megdermedt zselatinban az ondósejtek nem mozognak, ami csökkenti az anyagcsere folyamatok sebességét, emiatt a hígított ondót több napig fel lehet használni.

2.10 Kurkumin

A gyömbérfélék családjához (*Zingiberaceae*) tartozó kurkuma (*Curcuma longa*) Ázsiában őshonos lágyszárú, évelő növény. A kurkuma fehérjét (6,3%), zsírt (5,1%), ásványi anyagokat (3,5%), szénhidrátokat (69,4%) tartalmaz. Eszenciális olaj tartalma 5,8% (KAPOOR, 1990). A növény még tartalmaz béta karotint, aszkorbinsavat, niacint, kalciumot, vasat, cinket, káliumot a gyöktörzsben rostokat és flavonoidokat, de fő hatóanyaga a kurkumin (dicinnamiol-metán), amely egy sárga színű, antioxidáns hatású, zsírban oldódó, polifenol vegyület (AKRAM és mtsai, 2010). A kurkumin 3-4%-ban található meg a növényben és ez a vegyület adja a növény jellegzetes sárga színét. A kurkumin I (94%), kurkumin II (6%) és kurkumin III (0,3%) együttesen alkotják a kurkuminnak elnevezett vegyületet (RUBY és mtsai, 1995). Korábbi kutatási eredmények már bebizonyították, hogy a kurkumin képes a szuperoxid anion és a hidroxil gyököket semlegesíteni, tehát antioxidáns hatással rendelkezik (KUNCHANDY és RAO, 1990).

MOTTERLINI és mtsai (2000) leírták, hogy a kurkumin antioxidáns hatását az NF- κ B aktivitásának gátlásán, és a HO-1 enzim mennyiségének fokozásán keresztül fejti ki. A kurkumin továbbá képes csökkenteni a szabadgyökök okozta lipidperoxidáció mértékét, és az oxidatív stressz által okozott DNS károsodás lehetőségét is csökkenti. A klinikai gyakorlatban emiatt rák, ateroszklerózis és különböző neurodegeneratív betegségek kezelésére is felhasználják a kurkuma hatóanyagát (MENON és SUDHEER, 2007). BUCAK és mtsai (2012) bikasperma fagyasztásánál alkalmaztak kurkumin tartalmú (0,5mM és 2,0mM) tartalmú Tris-hígítót. A 0,5mM kurkumin tartalmú hígítóban kevesebb volt a morfológiai elváltozással rendelkező sejtek száma ($20,40 \pm 2,36\%$) a kontroll mintához viszonyítva ($30,60 \pm 1,47\%$, $P < 0,05$). A membránintegritás vizsgálatnál szintén a 0,5mM-os hígítóban volt több membránintakt sejt ($50,0 \pm 2,68\%$) a kontrollhoz képest. MENON és SUDHEER (2007) állításával szemben azonban a kurkumin kiegészítés nem befolyásolta a lipidperoxidáció mértékét, viszont növelte a glutation szintet a felolvasztott mintákban. SOLEIMANZADEH és SABERIVAND (2013) patkányspermát fagyasztottak 2,5mM kurkumin tartalmú hígítóban. Felolvasztást követően a kezelt mintákban a spermiumok

motilitása, életképessége és a DNS integritása is jobb volt a kontroll csoporttal összehasonlítva.

2.11 Nanoszelén

A szelén a normális, kiegyensúlyozott spermatermeléshez szükséges mikroelem. Szelénhiány esetében a spermiumok középrésze törékennyé válik, sérül a mitokondrium és feltekeredett fark alakul ki a sejteknél (PELYHE és MÉZES, 2013). A szelén antioxidáns hatású mikroelem, melynek különböző vegyületei eltérő antioxidáns kapacitással rendelkeznek. A vízben oldódó szelénsók túladagolása mérgezéshez vezet, míg a szerves szelén, szeleno-metionin és a szelenocisztein a legalkalmasabb vegyületek a takarmányok szelénszintjének emelésére. Az előbb említett szelénformák közül az elemi szelén a legkevésbé mérgező. Probiotikus joghurt baktériumok képesek a szerves szelén vegyületet szerves formává transzformálni. Bizonyos baktériumok úgy védekeznek a számukra már toxikus koncentrációjú szelénsó hatása ellen, hogy a citoplazmájukban elemi szelént állítanak elő és azt apró, nano méretű gömböcske formájában tárolják. A fermentáció során a megnövekedett nanoszelén koncentráció az oldatot vörös színűvé változtatja. Az előállított gömbök mérete baktériumfajtól függően 100-500 nanométer (ESZENYI és mtsai, 2011).

SHI és mtsai (2010) azt vizsgálták, hogyan változik búr fajtájú bakok spermaminősége, hereszövet struktúrája és a plazma glutation-peroxidáz aktivitása nanoszelénes takarmány kiegészítés hatására. A kísérletben 0,3 mg/kg Se takarmány kiegészítést kaptak a kísérleti állatok 12 héten keresztül. A vizsgálat végén a hereszövet szeléntartalma, a glutation-peroxidáz aktivitása szignifikáns mértékben nőtt a szelén kiegészítés hatására. A sperma mennyiségére, sűrűségére, motilitására és pH-jára viszont nem volt hatással a szelén. A kontroll csoportban viszont magasabb volt a morfológiailag rendellenes sejtek száma. A hereszövet vizsgálatánál a kontroll csoport kanyarulat csatornáinak membránja károsodott. RUJIE és mtsai (2009) szintén bakok esetében vizsgálta, hogy milyen hatása van a nanoszelénes takarmány kiegészítésnek a vér szeléntartalmára, glutation-peroxidáz aktivitására, hormontartalmára és a spermiumok morfológiájára. A szerzők arra a megállapításra jutottak, hogy a hereszövet szeléntartalma és a glutation-peroxidáz enzim aktivitása nőtt a takarmány kiegészítés hatására. A tesztoszteron, LH hormon szintjére viszont nem volt hatása a szeléntartalomnak.

2.12 Az áramlási citometria működési elve

Az áramlási vagy más néven flow citometria módszerének alkalmazásával kimutatható a sejtek membránjában, DNS szerkezetében történő változás (BROWN és WITTEWER, 2000). Mérés során a sejteket egy vagy több fluoreszcens festékkel jelöljük, amely a vizsgálni kívánt populációra specifikus. A minta jelölést követően a sejtek egy folyadék áramban haladnak végig egy optikai vagy elektronikus érzékelő előtt, mely a fluoreszcencia detektálására alkalmas. Értékelésnél a festékek által kibocsájtott fluoreszcens fényt detektálja a műszer. Mivel a különböző festékek, különböző hullámhosszon gerjesztődnek, ezért a festék jelenlétét különböző hullámhosszra érzékeny detektorok érzékelik. Fluoreszcens jelölés nélkül a sejtek mérete, granuláltsága és alakja is vizsgálható, mivel a jelöletlen sejtek is rendelkeznek egy úgynevezett autofluoreszcenciával. Az elemezni kívánt sejtek pontos detektálásához fontos, hogy jól elkülöníthetőek legyenek a sejtörmelékektől, hígító alkotóelemeitől, más sejtpopulációtól. Ezt az ún. kapuzással lehet elérni és ebben az esetben csak az általunk vizsgálni kívánt minta állapotáról nyerünk információkat. Flow citometriával végzett vizsgálatok nagy előnye a mikroszkópos értékeléssel összehasonlítva, hogy több ezer sejt értékelhető, emiatt precízebbek az eredmények (SHAPIRO, 2003; PETRUNKINA és mtsai, 2010).

A spermátológia területén a flow citometriás vizsgálat elterjedőben van. Jelenleg a sperma membrán- és DNS szerkezetének meghatározásához (BUNGUM, 2012) használják a módszert, de sperma sűrűség meghatározása (TSUJI és mtsai, 2002) a spermaszexálás (SHARPE és EVANS, 2009) is kivitelezhető áramlási citometria használatával. Elsősorban a membránintegritás, akroszóma integritás, mitokondriális aktivitás és DNS fragmentáció azok a paraméterek, mely citometria segítségével vizsgálhatóak. Amennyiben az előbb felsorolt tulajdonságokat genetikai vagy proteomikai vizsgálat is kiegészíti, úgy pontosabban előre jelezhető a vizsgált hímivarú állat fertilitása és az esetlegesen előforduló genetikai terheltség, amely vetéléshez, vagy az embrió malformációjához vezethet (PETRUNKINA és mtsai, 2007; CORDELLI és mtsai, 2005; MARTÍNEZ-PASTOR és mtsai, 2010).

3 ANYAG ÉS MÓDSZER

A dolgozatomban az alábbi négy kísérlethez tartozó vizsgálatokat mutatom be:

1. Kos sperma eltartása zselatinos hígítóban +5°C és +15°C-on
A/Debrecenben végzett kísérlet
B/Zaragozában végzett kísérlet
2. Szelénes takarmány kiegészítés hatása a spermatermelésre, vér szeléntartalmára és az ondóplazma fehérje-összetételére
3. Az évszak hatása a spermatermelésre és herekörméretére
4. A kurkumin és ondóplazma plazma kiegészítés hatása a kos spermára

1. táblázat: A vizsgálatok helyszínei, a kísérleti állatok és a kísérletek időpontjai

Sorszám	Helyszín	Fajta	Elhelyezés	Takarmányozás	Időpont
1/A	Debrecen	csókai cigája (n=4)	csoportos	ad libitum fű-és lucernaszéna, 20 dkg/nap/egyed gazdasági abrak (70% kukorica, 30% árpa), szelénes-nyalósó	2011. november 7.
1/B	Zaragoza	rasa aragonesa (n=6)	egyedi	ad libitum fűszéna, 35 dkg/nap/egyed granulált táp, szelénes nyalósó	2013. március-május (4 ismétlés) 2013. október-december (4 ismétlés)
2	Debrecen	fehér dorper (n=12)	csoportos	ad libitum fű-és lucernaszéna, 20 dkg/nap/egyed gazdasági abrak (70% kukorica, 20% zab, 10% árpa), Szelénes nyalósó	2012. szeptember 18-december 8.
3	Debrecen	dorper (n=8), fehér dorper (n=8)	csoportos	ad libitum fű-és lucernaszéna, 20 dkg/nap/egyed gazdasági abrak (70% kukorica, 20% zab, 10% árpa), natúr nyalósó	2012. április 16.-december 8.
4	Zaragoza	rasa aragonesa (n=6)	egyedi	ad libitum fűszéna, 35 dkg/nap/egyed granulált táp, szelénes nyalósó	2013. március-május (4 ismétlés) 2013. október-december (4 ismétlés)

Az 1/A kísérletet a Debreceni Egyetem Kismacsi Kísérleti Telepén végeztem, a kísérlethez 4 cigája kos ejakulátumát használtam fel. A tenyészkosok az anyajuhoktól elkülönítetten, csoportos, növekvő mélyalmos tartásban voltak elhelyezve a juhhodályban, melyhez kifutó is csatlakozott. A kosok fű-és lucernaszénát, gazdasági abrakot kaptak takarmányként, emellett szelén nyalósót. 2011. november 7-én került sor a kosok ugratására egy beton padozatú spermavételi helységben, amely a kifutóhoz tartozott. A vizsgálatot megelőző 80 napban a kosoktól heti két alkalommal történt ondóvétel. A termékenyítőanyag levételére juh műhüvelyt és szimpla falú spermavételi poharat használt az ugrató-technikus. Spermavételt követően az ondó makroszkópos, mikroszkópos tulajdonságait értékeltem, majd kevert mintát készítettem az ejakulátumokból, az egyedi hatás kiküszöbölése végett (1. táblázat).

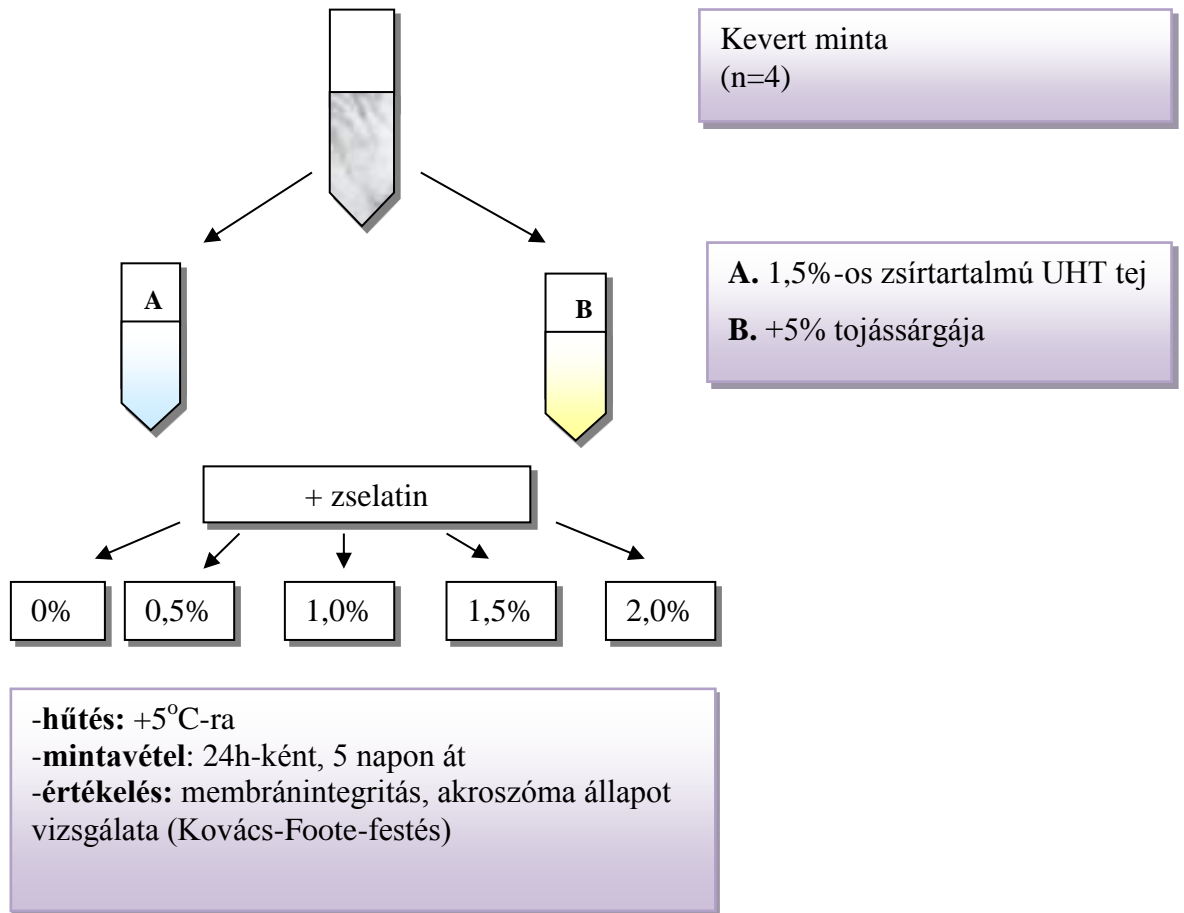
A 2. kísérletbe a Debreceni Egyetem Kismacsi Kísérleti Telepén lévő 12 fehér dorper kost vontunk be, melyek 1,5 éves korúak voltak a vizsgálat megkezdésekor. A spermavétel a kísérlet 0; 42; 49; 56; 63; 70; 86 napján, vérvétel a 0; 42; 56; 70; 86. napon történt. A kosok a számukra kialakított épületben voltak elhelyezve, csoportos tartásban. Takarmányuk fű-és lucernaszéna, valamint 30 dkg szemes kukorica volt. A konyhasósziükséglet kiegészítésére natúr nyalósót kaptak (1. táblázat).

A 3. kísérletben dorper és fehér dorper fajtájú kosok spermaminőségének és herekörméretének alakulását vizsgáltam különböző évszakokban. Spermavétel és herekörmérés heti egy alkalommal történt. Az állatok a Debreceni Egyetem Kismacsi Kísérleti Telepén csoportosan voltak tartva. A mérések idején a kosok 1,0-1,5 éves korúak voltak. Takarmányuk fű- és lucernaszéna valamint 40 dkg gazdasági abrak (70% szemes kukorica, 30% zab). A kísérlet ideje alatt a kosok nem fedeztek, ezért nem volt szükség az abrakadagok növelésére tenyészidőszak során sem (1. táblázat).

Az 1/B és a 4. kísérlethez a Zaragozai Állatorvosi Egyetem Kísérleti Telepén tartott 12 rasa aragonosa kos ejakulátumát használtam fel. A munka során a 2013. március-május és október-december időszakban begyűjtött termékenyítő anyagot használtam fel a vizsgálatokhoz. A tenyészkosok az anyajuhoktól elkülönítve, külön épületben voltak elhelyezve, egyedileg. A juhok fűszénát és granulált, tenyészkosok számára készített takarmányt, illetve szelén nyalósót kaptak. Hétfőn, szerdán és pénteken 6 kostól történt spermavétel a másik hat egyedtől kedden és csütörtökön, a kora reggeli órákban. Az első ugratás során nyert termékenyítőanyag nem került a kísérletben felhasználásra, minden esetben a második ejakulátumot használtam. Ennek oka, hogy a második ugratásból származó ejakulátum motilitása és életképessége jobb,

mint az elsőé (OLLERO és mtsai, 1996) (1. táblázat). Mindkét kísérletet négy ismétlésben végeztem el.

3.1 Kos sperma eltartása zselatinos hígítóban +5°C-on



9. ábra: Az 1/A kísérlet elrendezése

3.1.1 Motilitás, sűrűség meghatározása

A kísérletben 4 cigája kos ejakulátumát használtam fel. Ugratást követően először az ejakulátumok mennyiségét határoztam meg a duplafalú spermavételi poháron lévő skála segítségével, majd a spermiumok tömegmozgását OLYMPUS BX64 fáziskontraszt-mikroszkóp segítségével, 400x-os nagyítás mellett (9. ábra). Az értékeléshez SALAMON (1987) módszerét használtam (2. táblázat). A progresszív motilitás értékelését 0-100%-os skálán végeztem el.

2. táblázat: A motilitás értékelő rendszere

(Forrás: SALAMON, 1987. In: PÉCSI T., 2007)

Érték	Osztály	A mikroszkópos kép leírása
5	Nagyon jó	Sötét, nagyon gyors mozgású hullámok, egyedi mozgás nem figyelhető meg. Az aktív spermiumok aránya elérheti a 90%-t.
4	Jó	Erőteljes mozgás, de a hullámok nem olyan gyorsak, mint az 5. értéknél. Az aktív sejtek aránya 70-85%.
3	Elfogadható	Csak kisebb, lassabban mozgó hullámok figyelhetők meg. Egyedi spermiumok megfigyelhetők. Az aktív sejtek aránya 45-65%.
2	Gyenge	Tömegmozgás nincs, a spermiumok nem alkotnak hullámokat, néhány mozgó spermium látható. Az élő sejtek aránya 20-40%, mozgásuk gyenge.
1	Igen gyenge	A spermiumok 10-15%-a mutat életjeleket, gyenge mozgást.
0	Holt	Az életnek nincs jele, valamennyi sejt mozdulatlan.

Az ondó sűrűségét Minitube Photometer SDM5 fotometriás készülékkel értékeltem. A sejtszám meghatározásához 6 μ L spermamintát hígítottam 594 μ L 0,9%-os NaCl oldatban. Vizsgálatot követően a négy mintát egy spermavételi pohárba öntöttem, homogenizáltam, majd 5-5 egyenlő részre osztottam és 37°C-os vízfürdőbe helyeztem a hidegsokk elkerülése érdekében. Az ondó hígításának alapelve az volt, hogy a cervikális inszeminálásnál alkalmazott koncentrációt használjam, ezért a hígítás utáni sejtszámot 400x10⁶ spermium/ml-re állítottam be. A hígítást két különböző összetételű hígítóval végeztem. Az egyik 1,5%-os zsírtartalmú UHT-tej, a másik 1,5%-os zsírtartalmú UHT-tej + 5% tojássárgája. Mindkét hígítóhoz 0%; 0,5%; 1,0%; 1,5%; 2,0%-ban adtam Dr. Oetker lapzselatint (Bloom szám=200). A zselatint nem tartalmazó (0%) hígított mintákat kontrollként használtam. Hígítást követően az ondót fokozatosan hűtöttem le +5°C-ra vízfürdőben, majd öt napon át ezen a hőmérsékleten tároltam a mintát egy hűtőszekrényben. A hígított ejakulátumból 24h-ként mintát vettem és értékeltem a különböző spermaminőségi tulajdonságokat.

3.1.2 Membránintegritás, akroszóma állapot vizsgálata

Az élő/elhalt sejtek számát és az akroszóma állapotát Kovács-Foote festéssel határoztam meg (KOVÁCS és FOOTE, 1992; NAGY és mtsai, 1999, KÚTVÖLGYI, 2006). A spermamintákat 0,825% NaCl+0,06% K₂HPO₄ + 0,1% formalin oldattal hígítottam 100x-os mértékben. Majd egy cseppet tárgylemezen elkevertem egy csepp Chicago Sky Blue 0,16%-os izotóniás festékoldattal, amely az élő és holt ondósejtek elkülönítésére alkalmas festék. Egy másik tárgylemez segítségével két kenetet készítettem, majd levegőn közel függőleges helyzetben szárítottam. Száradást követően a mintákat 4 percre fixáló oldatba (86mL 1N HCl, 14mL 37%-os formaldehid oldat, 0,2g neutrálvörös (Sigma N 2880) helyeztem. A fixált keneteket folyó csapvízzel, majd desztillált vízzel öblítettem. Ezt követően az akroszóma festésre használt 7,5%-os Giemsa-oldatban (50mL desztillált víz + 4mL Sigma GS 500 Giemsa törzsoldat) 38°C-on, 4 órán keresztül festődtek a kenetek, majd folyó csapvízzel és desztillált vízzel öblítettem a mintákat. A már megszáradt keneteket xilolban oldott 1%-os vajsárga (dimethyl yellow, Sigma D6760) és kanadabalzsam (Canada Balsam, Sigma C1795) 3:1 arányú keverékéből álló oldattal fedtem le. A keneteket 400x-os nagyítással, OLYMPUS BX64 fénymikroszkóp segítségével értékeltem. Az ondósejtek bírálatát a tárgylemez több pontján is elvégeztem. Lemezenként 200 spermiumot az alábbi csoportokba soroltam:

Spermium

- **élő:** világos (fehér-halvány rózsaszín)
- **elhalt:** sötét

Akroszóma

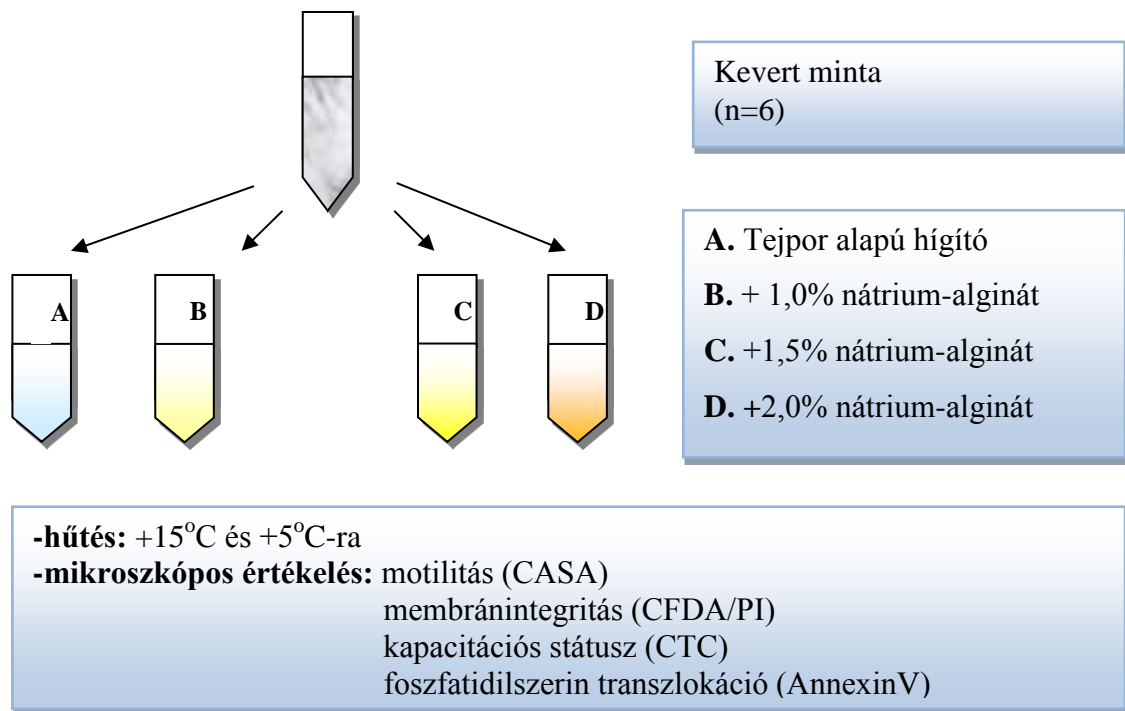
- **ép:** bíborvörös
- **fellazult:** sötét levendula
- **sérült:** világos levendula
- **nincs:** világos apikális rész (NAGY, 1999) (10. ábra)



10. ábra: Élő/elhalt akroszóma festéssel jelölt spermiumok

(Forrás: DR. EGERSZEGI ISTVÁN felvétele)

3.2 Kos sperma eltartása zselatinos hígítóban +5°C és +15°C-on

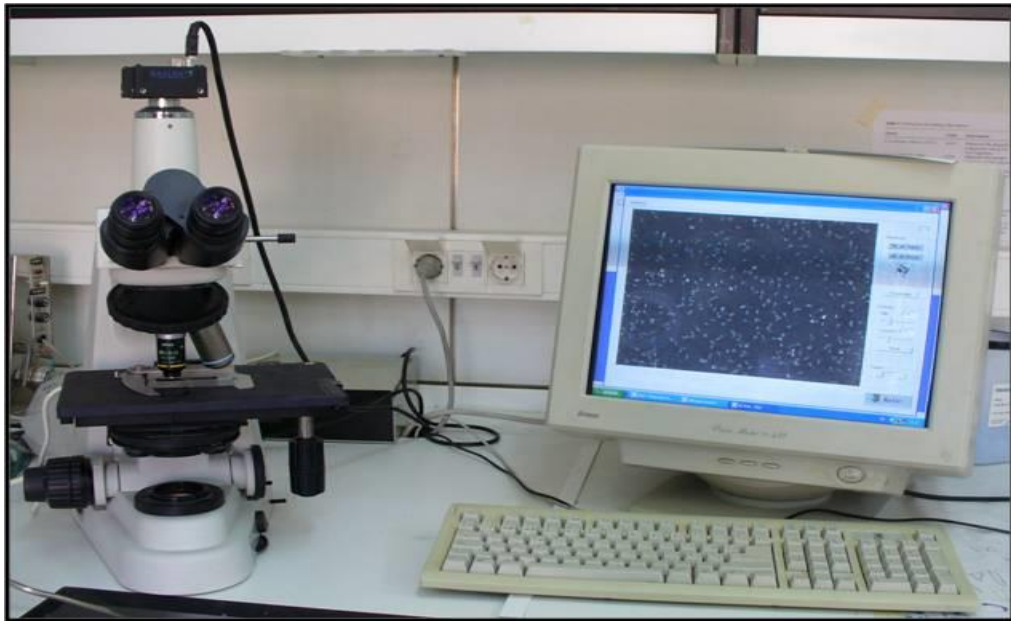


11. ábra: Kísérleti elrendezés 1/B kísérlet

3.2.1 Motilitás, sűrűség meghatározása

A Zaragozában végzett vizsgálatban 6 rasa aragonesa kos második ugratásból származó ejakulátumát használtam fel, melyekből kevert mintát készítettem. A mintából 10 μ L-t hígítottam 90 μ L PBS-ben és ezt a hígítási arányt használtam a motilitás értékeléséhez. Majd ebből 50 μ L-t 450 μ L MiliQ vízhez pipettáztam a sűrűség meghatározásához. A motilitás meghatározásához CASA rendszert (ISAS 1.0.4; Proiser SL, Valencia, Spanyolország) használtam. Az értékelésnél a küszöbértékek az alkategóriák között az alábbiak voltak: slow velocity: 10-45 μ m/sec; medium velocity: 45-75 μ m/sec; fast velocity: >75 μ m/sec, progresszív spermium: >80% STR. A vizsgálatához a mintából 6 μ L-t cseppentettem tárgylemezre, majd fedőlemezrel fedtem le és vizsgálatig 37°C-on inkubáltam (11. ábra). Az értékelést 100x nagyítás mellett végeztem el, ahol az összmotiliást (total motility) és a progresszív motilitást (progressive motility) határoztam meg. Mintánként 8 ponton határoztam meg az ondósejtek mozgását, minimum 1000 spermium/mintát értékelve. A motilitás vizsgálatát Basler A312f kamera és Nikon Eclipse 50i fáziskontraszt mikroszkóp segítségével végeztem (12. ábra).

A sűrűség meghatározásához a hígított mintából 6 μ L-t Bürker-kamrába cseppenttem, majd meghatároztam a sperma koncentrációját. A kamra egyes négyzeteiben megszámláltam a hímvarsejtek számát, majd ezt átlagoltam.

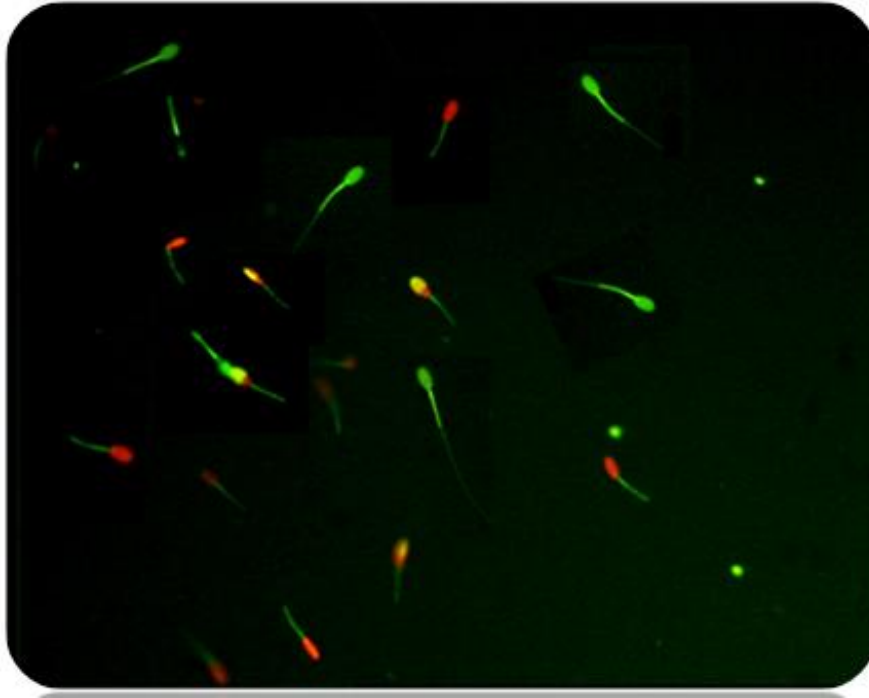


12. ábra: Motilitásvizsgálat CASA -rendszer segítségével

(Forrás: BIOZAR's Group, Department of Biochemistry and Molecular and Cell Biology of the University of Zaragoza)

3.2.2 Membránintegritás vizsgálata

A membránintegritás vizsgálatát CFDA (karboxi-fluoreszcein diacetát) és PI (propídium-jodid) fluoreszcens festékekkel határoztam meg HARRISON és VICKERS (1990) módszere alapján. A karboxi- fluoreszcein-diacetát, mint apoláros molekula könnyen áthatol a membránok lipidfázisán, majd az élő sejtekben enzim-hatásra lehasad az acetát molekula és poláros fluoreszcein keletkezik, amely már nem tud a membránon áthatolni, így az élő, intakt sejtek zöld fényel fluoreszkálnak. Amennyiben a spermiumok plazmamembránja sérült, úgy csak az akroszóma és/vagy mitokondriumok festődnek, míg a sérült sejtek festetlenek maradnak. A fluoreszcein-diacetát akkumulációjával, valamint a fluoreszcein kiáramlásával jól nyomon követhető a membrán permeabilitásának változása. A sérült sejtek jelölésére alkalmas a propídium-jodid (PI), melyek piros színnel fluoreszkálnak (HARRISON és VICKERS, 1990).



13. ábra: Harrison-Vickers-féle fluoreszcens festéssel jelölt spermiumok. Zöld színnel festődnek a membránintakt (CFDA+), piros színnel a sérült sejtek (PI+)

(Forrás: BIOZAR's Group, Department of Biochemistry and Molecular and Cell Biology of the University of Zaragoza)

Reagensek

- Formalin 0,5% (v/v): (125 μ L 37%-os formaldehid + 10mL H₂O)
- CFDA (6-karboxi-fluoreszcein diacetát): 0,46mg/mL törzsoldat DMSO-ban oldva
- PI (propidium-jodid): 0,5mg/mL törzsoldat vízben oldva
- PBS: szacharóz 0,25M
- EDTA 0,1M
- Na₃PO₄ puffer (pH=7,5) 4,0mM
- 10x HEPES: glükóz 50mM, HEPES 100mM, KOH 20mM

A friss spermát egy 1,5 mL-es sárga eppendorf csőben, 5×10^6 sejt/mL koncentrációra hígítottam PBS-sel. 1 mL mintához 5 μ L formalin 0,5% (v/v), 5 μ L CFDA, 5 μ L PI-ot adtam, majd a mintákat 37°C-on, sötétben 15 percig inkubáltam. A festett spermamintából 6 μ L-t cseppentettem tárgylemezre, majd fedőlemezzel fedtem és kenetenként 200 sejtet értékeltem. Az értékelését Nikon Labophot-2 fluoreszcens

mikroszkóppal végeztem, 400x-os nagyítás mellett, kék szűrőt (B-2A: 450-490 nm hullámhossz) használva.

A mikroszkópos értékelés során két spermacélpopulációt különítettem el, amit az 10. ábrán lehet látni:

A: **Élő sejtek, ép plazmamembránnal rendelkező sejtek** (CFDA⁺/PI)

B: **Elhalt sejtek** (CFDA⁻/PI⁺) (13. ábra).

3.2.3 Kapacitációs státusz meghatározása

A kapacitáció állapotának meghatározását klórtetraciklin (CTC) fluoreszcens festéssel végeztem. A kapacitációs státusz értékelésére a GILLAN és mtsai (1997) által leírt klórtetraciklin festést alkalmaztam, amit ETDH₁-festéssel kombináltam, hogy a spermiumok életképessége is értékelhető legyen (GRASA és mtsai, 2006).

Reagensek

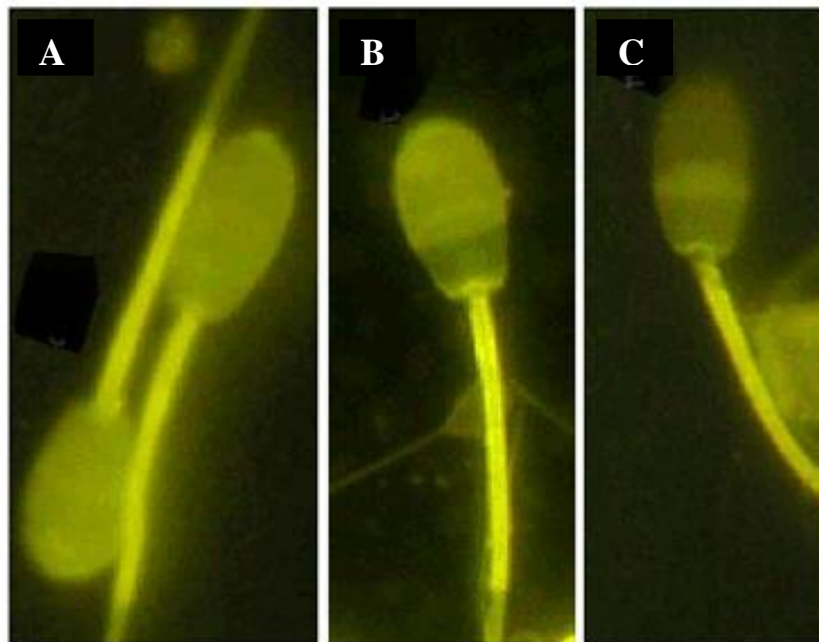
- CTC puffer (pH=7,8): 130mM NaCl, 20mM TRIS, 5mM cisztein
- klórtetraciklin: 0,4mg/mL CTC puffer-ben oldva
- fixáló: 1,25% (v/v) paraformaldehid 0,5M TRIS–HCL-ban feloldva
- AntiFading: 0,22 M DABCO glicerin/PBS 9:1 arányban oldva
- ETDH₁ (etidium-homodimer): 23,3μm ETDH₁:97,67 μL H₂O + 2,33μL ETDH₁ 1mM

A spermaminta 100μL-ét PBS-el 4×10^7 sejt/ml koncentrációra hígítottam, majd ebből 18μL-t egy 100μL-es, sárga eppendorf csőbe pipettáztam. Ehhez 2μL ETDH₁-et adtam, majd a mintát 37°C-on, sötétben tároltam 10 percig. Inkubációt követően 20μL CTC puffert és 6μL fixálót adtam a vizsgálati anyaghoz és 30 percig, 8°C-on hűtőben tároltam. Ezt követően egy tárgylemezre cseppenttem 3μL Antifadingot, majd ebbe 6 μL-t a mintából. A mintákat fedőlemezzel fedtem, majd azt színtelen lakkal körülvéve fixáltam. Amennyiben nem került a minta azonnali értékelésre, akkor a kenetet fagyasztva tároltam értékelésig. A keneteket 1000x nagyítással, Nikon Eclipse E-400 mikroszkóp segítségével értékeltem. A kapacitációs státusz vizsgálatához lila szűrőt (V-2A; 380-420 nm), míg az elhalt spermiumok értékeléséhez (ETDH₁ pozitív sejtek) zöld szűrőt (G-2A; 510-560 nm) használtam. Lemezenként 200 spermiumot értékeltem. Kapacitációs státusz alapján a sejtek alábbi három fő csoportja különíthető el.

1. **NC (non-capacitated):** Ép akroszóma membránnal rendelkező sejtek, amelyeknek a feje egyenletesen festődött és nem látható halo (fénykoszorú) a fej ekvatoriális régiója körül.
2. **C (capacitated):** A postakroszómális régióban nem fluoreszkál a sejt
3. **R (reacted):** Az akroszómareakción átesett sejtek, amelyek nem fluoreszkálnak és csak az ekvatoriális régióban látható halo (14. ábra)

A minták elemzésénél az életképességet is vizsgáltam (ETDH₁- festés) és ennek alapján az alábbi 5 kategóriába soroltam a sejteket:

1. **NCL (non capacitated, live):** ép akroszómamembránú, élő sejt
2. **NCD (non capacitated, dead):** ép akroszómamembránú, elhalt sejt
3. **CL (capacitated, live):** kapacitált, élő sejt
4. **CD (capacitated, dead):** kapacitált, elhalt sejt
5. **R (reacted):** akroszómareakción átesett sejt



14. ábra: CTC-festéssel jelölt spermiumok

A: ép akroszmával rendelkező sejt (NC), B: kapacitált sejt (C), C: akroszómareakción átesett sejt (R)

(Forrás: ALBRIZIO és mtsai, 2005)

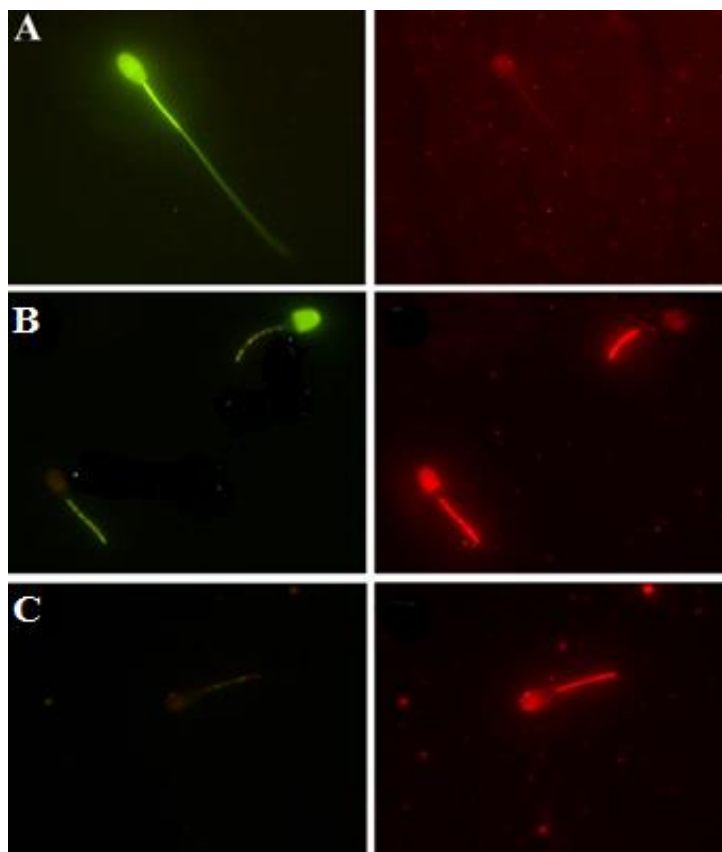
3.2.4 Foszfátidilszerin transzlokáció meghatározása

Reagensek

- Apoptosis Detection Kit
 - CFDA
 - Anexina V-Cy3.18
 - Annexin puffer (10x)
- Formalin 0,5% (v/v): (125 μ L 37%-os formaldehid + 10mL H₂O)

A sejtek jelölése előtt 1800 μ L MiliQ vízben oldottam fel 200 μ L 10x Annexin puffer oldatot (1x Annexin puffer), amiből 450 μ L-t pipettáztam egy, sárga színű, 1,5 mL-es eppendorf csőbe. A spermát 300 μ L (2x10⁷ sejt/mL-re) hígítottam, majd ehhez 5 μ L CFDA és 1 μ L Annexin V festéket adtam. A mintát 15 percig inkubáltam szobahőmérsékleten, sötétben. Ezt követően 5 μ L formalin 0,5% (v/v) fixáltam a sejteket. A keneteket Nikon Eclipse E-400 mikroszkóp segítségével értékeltem 1000x nagyítással. Az élő sejteket (CFDA+) kék szűrő (B-2A, 450-490 nm), a foszfátidilszerin transzlokációt mutató sejteket (AnnV+) zöld szűrő (G-2A, 510-560 nm) segítségével értékeltem. Kenetenként 200 sejt került értékeltem és az alábbi három kategóriába soroltam:

1. **CFDA+/AnnV-:** élő, intakt sejtek
2. **CFDA+/AnnV+:** kapacitálódott sejtek
3. **CFDA-/AnnV+:** elhalt sejtek (15. ábra)



15. ábra: Annexin-V festéssel jelölt spermiumok

A: Élő, intakt sejtek (CFDA+/Annx-V-), B: Kapacitált sejtek (CFDA+/Annx-V+)

C: Elhalt sejtek (CFDA-/Annx-V+)

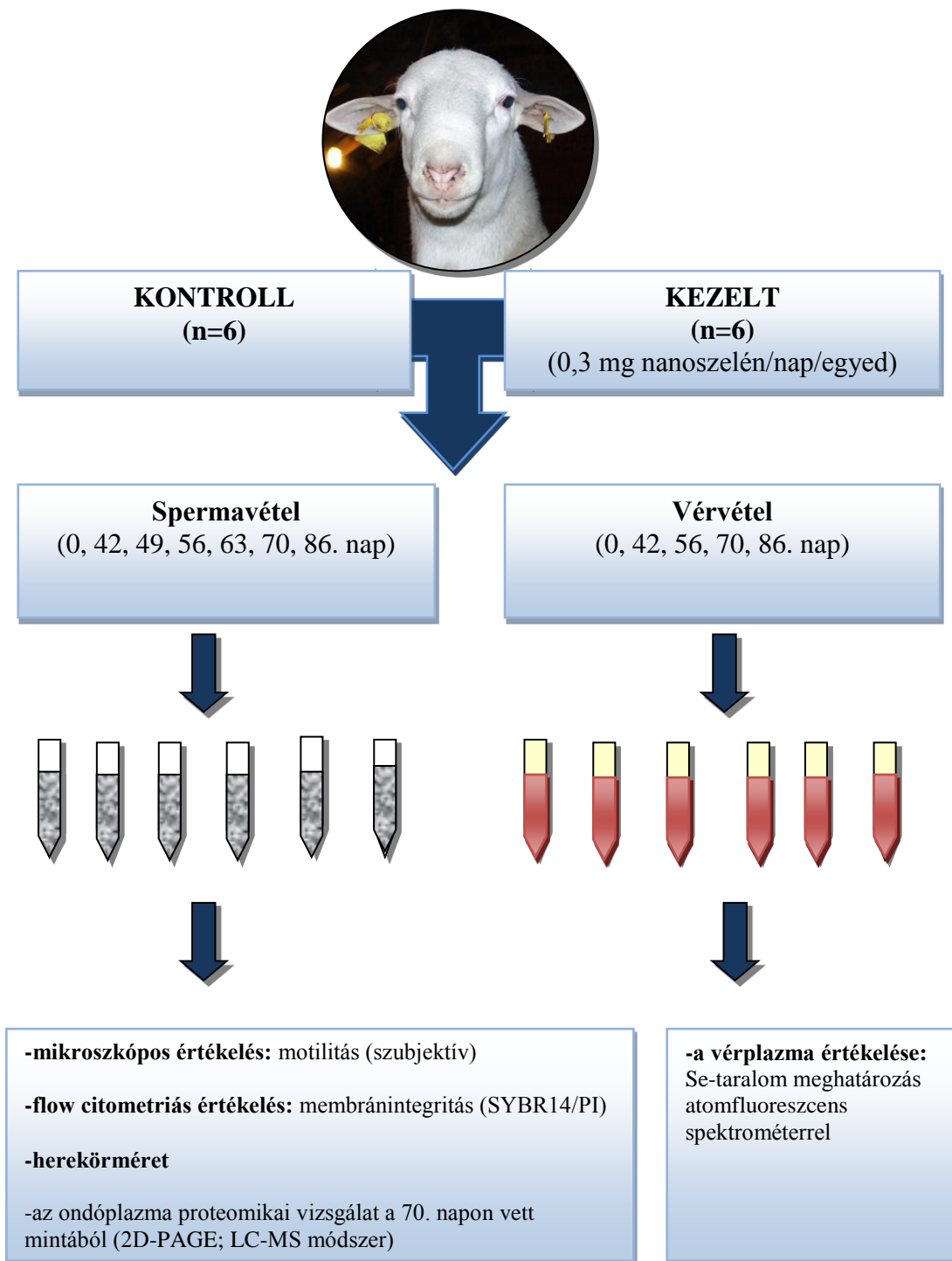
(Forrás: BIOZAR's Group, Department of Biochemistry and Molecular and Cell Biology of the University of Zaragoza)

3.2.5 A hűtés folyamata

A spermaminták hígítását $+30^{\circ}\text{C}$ -on végeztem el, majd ezt követően a hűtéshez használt csöveket parafilmmel fedtem le és a 30°C -os vízfürdőbe helyeztem, majd a mintákat 15°C -ra hűtöttem. A hűtési folyamat végén a hígított ejakulátumot hűtőkamrában tároltam $+15^{\circ}\text{C}$ -on további 30 percen át, majd elvégeztem a minták értékelését.

A zselatinnal végzett második kísérletben a mintákat $+5^{\circ}\text{C}$ -ra hűtöttem le, majd a $+5^{\circ}\text{C}$ -os hűtőkamrába helyeztem. Ezt követően a hígított ondóból 0, 24, 48h elteltével mintát vettem, majd meghatároztam a friss spermánál is értékelt paramétereket.

3.3 Szelénes takarmány kiegészítés hatása a spermatermelésre, vér szeléntartalmára és az ondóplazma fehérje-összetételére



16. ábra: A 2. számú kísérlet elrendezése

3.3.1 Motilitás és sűrűség meghatározása

A motilitás, sűrűség meghatározását az 1/A kísérletben ismertetett módszer szerint végeztem el (16. ábra).

3.3.2 Membránintegritás meghatározása

A plazmamembrán integritás vizsgálatát SYBR14/PI fluoreszcens festéssel végeztem. A SYBR14 az élő sejteket jelöli, melyek zöld színnel fluoreszkálnak, az elhalt sejteket jelölő propidium jodid (PI) pedig vörösen fluoreszkáló festék.

Reagensek

- SYBR 14: törzsoldat: LIVE/DEAD Sperm Viability Kit (L-7011, Molecular Probes) Munkaoldat: 1:10 arányban hígítva DMSO-val (Molecular Probes, online Fluorescent Handbook).
- PI: LIVE/DEAD Sperm Viability Kit (L-7011, Molecular Probes)
- HEPES puffer: 10mM HEPES, 150mM NaCl, 10% BSA, pH=7,4

A festési eljárás során a friss spermát $1,5 \times 10^6$ koncentrációra hígítottam HEPES pufferrel, majd ehhez $1 \mu\text{L}$ SYBR14 munkaoldatot és $5 \mu\text{L}$ PI-ot, ezt követően 10 percig, 37°C -on inkubáltuk, majd BD FACSCalibur citométer segítségével értékeltük.

3.3.3 Ondóplazmafehérjék kivonása, azonosítása

A kísérlet 70. napján mindkét csoport szeminális plazmáját felhasználtuk a fehérjeprofil meghatározására. A szeminális plazma fehérjék azonosítása 2D-PAGE és LC-MS módszer segítségével történt. A kétdimenziós elektroforézis (2D-PAGE) a fehérjék elválasztásához használt módszer. A folyamat során az első lépés az izoelektromos fókuszálás (első dimenzió), ahol a fehérjék elválasztása az izoelektromos pont (pI) alapján történik. A második dimenzió az SDS-PAGE, melyben a fehérjék szeparálása méretük alapján történik. A gélben lévő fehérjék Coomassie, ezüst vagy fluoreszcens festéssel azonosíthatóak. A módszer előnye, hogy alkalmas a teljes proteomok vizsgálatára és a fehérjék kvantitatív és kvalitatív változásainak nyomon követésére. A szeminális plazma szeparálása CARDOZO és mtsai (2006) által leírt módszer alapján történt. Az ondómintákat kétszer centrifugáltam (7500rpm, 5 perc.) szobahőmérsékleten, majd az ondóplazmát egy Eppendorf csőbe pipettáztam. Ehhez 10%-os proteáz-, foszfatáz inhibitor koktélt adtam (Fermentas Inc., Germany), majd a

mintákat felhasználásig -20°C -on tároltam. Felolvasztást követően meghatároztam a minták fehérje koncentrációját, protein assay kit (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) használatával. A standard fehérjeoldatként bovin szérum albumint (BSA) használtam. A fehérjetartalmat BRADFORD (1976) módszere alapján mértem.

3.3.4 Kétdimenziós poliakrilamid gélelektroforézis (2D-PAGE)

A mintákból $75\mu\text{g}$ fehérjét 7cm -es $\text{pH}=5\text{-}8$ -as IGP stripekre vittem fel. A fehérjéket $125\mu\text{L}$ minta pufferben (8M urea, 2% [3-(3-(cholamydopropyl) dimethylammonio)-1 propane sulphonate] (CHAPS), 40mM dithiothreitol (DTT), $0,2\%$ Bio-LyteTM 3/10 ampholyte (Bio-Rad), $0,0002\%$ Bromophenol Blue (Sigma-Aldrich Chemical Co.) oldottam fel. A stripeket egy éjszakán keresztül tartottam a minta pufferben, majd elvégeztük a fókuszálást Protean IEF Cell (Bio-Rad) rendszerben. Az első dimenziónál több lépéses fókuszálás történt: 1 lépés: -250V , 20 min , Linear Ramp, 2. lépés: 4000V , $2,5\text{H}$, Linear Ramp, 3. lépés: 13.000Vh , Rapid ramp, 20°C -on, $50\text{mA}/\text{strip}$. A fókuszált stripeket SDS-PAGE előtt ekvilibráltam. A stripeket 10 percig inkubáltam az ekvilibráló I. oldatban (6M urea, 20% (v/v) glicerin, 2% (w/v) SDS, 50mM Tris $\text{pH}=8,8$, 2% (w/v) DTT), majd további 10 percig az ekvilibráló II oldatban (6M urea, 20% (v/v) glicerin, 2% (w/v) SDS, 50mM Tris $\text{pH}=8,8$, $2,5\%$ (w/v) iodoacetamide. Második dimenzióban a futtatást 13% -os poliakrilamid gélen végeztem el, BioRad Protean Plus Dodeca cell rendszerben. A futtató puffer $1\times$ Tris-Glycin-SDS oldat volt. A poliakrilamid géleken lévő fehérje foltok láthatóvá tételére ezüstfestés alkalmaztam, Page Silver Staining Kit (Fermentas). A festék érzékenysége 1ng . Az ezüstfestés lépései: 1. fixálás: 50% metanol, 5% ecetsav 2. mosás: 50% metanol 3. érzékenyítés: $1,27\text{ mM}$ nátrium-tioszulfát-pentahidrát 4. festés: $0,15\%$ ezüst nitrát 5. előhívás: $0,04\%$ formaldehid, 2% nátrium karbonát 6. leállítás: 5% ecetsav. A géleket futtatást követően szkenneltem, amihez Molecular Imager PharosFX Plus System (Bio-Rad) programot használtam. A gélek elemzése Delta2D software (DecodonTM GmbH, Germany) segítségével történt. Mintánként két futtatást végeztem. A kontroll és a szelénnel kezelt csoport közötti fehérje expressziós különbséget Student's t-test statisztikai értékeléssel történt. Az eredmények alapján csak azok a fehérjék kerültek azonosításra LC- MS módszerrel, melyek expressziójában különbség volt.

3.3.5 A fehérjék azonosítása LC-MS-módszerrel

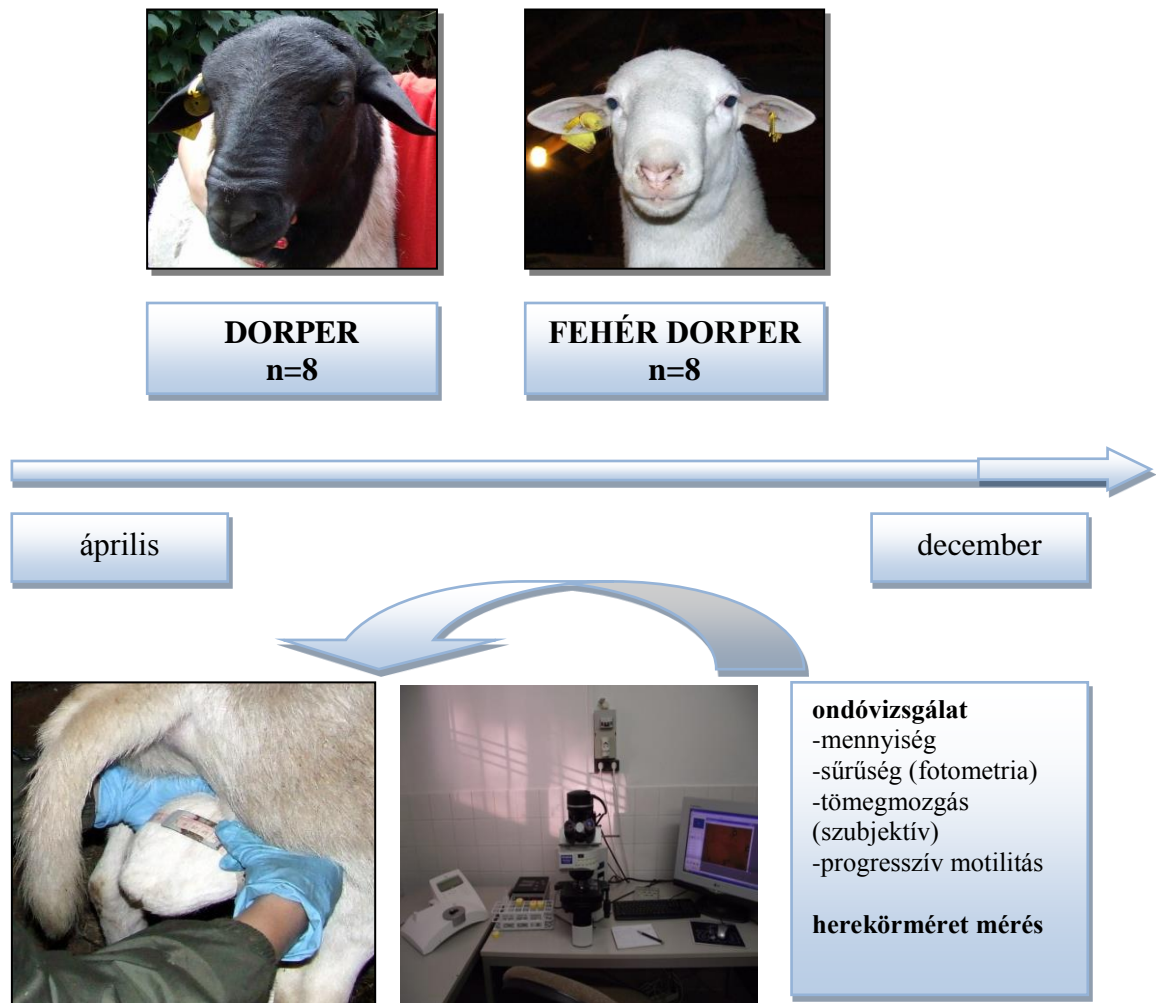
Az expressziós különbséget mutató fehérje spotok meghatározását folyadék kromatográffal kapcsolt tömegspektrometria (LC-MS) módszerrel végeztük. A fehérjék emésztése a SZABÓ és mtsai (2012) által közölt eljárással történt. A kivágott spotokat egy szike segítségével apró darabokra vágtuk. A fehérjék előhívására szolgáló festék kivonására 25mM ammónium-bikarbonát oldatot használtunk, mely 50% (v/v) acetonitrilt is tartalmazott. Ezt követően dehidratálást végeztünk acetonitrillel, majd kiszárítottuk a gél darabokat. A gélek rehidratálását 12,5ng/μL tripszinnel végeztünk, melyet 25mM ammónium-bikarbonát oldatban vettünk fel. A gél darabokat 37°C-on inkubáltuk egy éjszakán át. A fehérjék kivonása 5% (v/v)-os hangyasav oldattal történt. Ezt két mosás követte 60%-os acetonitrillel, mely 1% (v/v) hangyasavat tartalmazott. Az LC/MS analízis előtt a mintákat vákuum centrifuga segítségével koncentráltuk. Az emésztett fehérje minták analízisét Waters NanoAcquity UPLC rendszerrel végeztük, melyhez egy Micromass Q-TOF Premier tömegspektrométert kapcsoltunk. A WATERS Proteinlynx GlobalServer 2.4 szoftvert használtuk az adatok feldolgozására az alapértelmezett beállítások használatával. A Swissprot adatbázisban (Swissprot 2012_05 database (2012.05.10 release, 535,698 entries) történő kereséshez Mascot 2.2-t (Matrix Science, London, UK) használtunk. Scaffold szoftver (version Scaffold 3.62, Proteome Software Inc., Portland, OR) alkalmazásával végeztük el az MS/MS alapú peptid és fehérje analízis validálását. Pozitív találatként azokat a fehérjéket fogadtuk el, amelyeket legalább két, min. 95%-os konfidenciával azonosított peptid szekvenciával tudtuk alátámasztani.

3.3.6 A vér szeléntartalmának meghatározása

A vérminták szeléntartalmának meghatározása KOVÁCS és mtsai (2000) módszere szerint történt. A vizsgálatához 1mL vérszérumhoz 5mL cc. HNO₃-t (65 m/m%) adtunk, majd 60 percen át tartó, 60°C-on történő előroncsolást követően 3mL cc. H₂O₂-t (30 m/m%) hozzáadva 4h-án át 120°C-on tovább roncsoltunk. A mintákat ezután 10mL-re hígítottuk 3M-os sósavval, majd szűrőpapíron átszűrtük. A méréseket Millenium Merlin Atomic Fluorescence Spectrometer segítségével végeztük a következő beállításokkal: 15 liter/perc argonáram, 40 másodperc mintaszívás, 40 másodperc mosás, 100x gain. Kalibráláshoz Charlau standardot használtunk. Minden 5. mintát követően minőségkontroll oldattal ellenőriztük a mérés

pontosságát. Redukáló reagensként 3M-os sósavat, hibrid reagensként 1,4 m/V% NaBH_4 -ot használtunk, 0,1 M NaOH-ban. A minták mérését háromszor ismételtük meg.

3.4 Az évszak hatása a spermatermelésre és herekörméretére

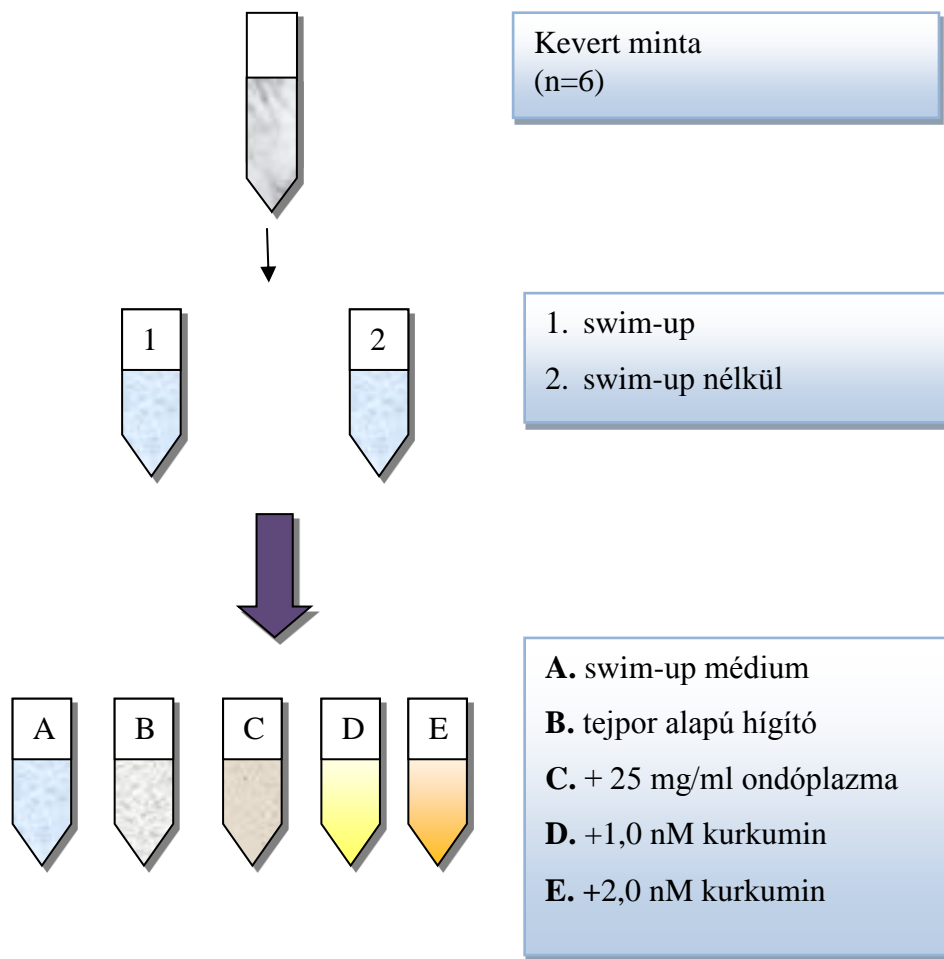


17. ábra: A 3. számú kísérlet elrendezése

3.4.1 Motilitás, sűrűség, morfológia meghatározása

A harmadik kísérletet a Debreceni Egyetem Kismacsi Kísérleti Telepén végeztem 2013. április 16 és december 8-a között. A spermavétel és a vizsgálat hetente egy alkalommal történt, majd az 1/A kísérletben ismertetett módon határoztam meg az ondó mennyiségét, sűrűségét, tömegmozgását. A herekörméret mérésére a scrotum legszélesebb részén került sor, az erre a célra kialakított mérőszalag segítségével (17. ábra).

3.5 A kurkumin és ondóplazma plazma kiegészítés hatása a kos spermára



-hűtés: +5°C és +15°C-ra

-flow citometriás értékelés: membránintegritás (Mitotracker Deep Red)
kapacitációs státusz (CTC)
foszfátidiszlerin transzlokáció (Annexin V- FITC Apoptosis Detection Kit)
kaspáz aktivitás (Caspase-3 and -7 Detection Kit)
DNS fragmentáció vizsgálata (Tunel Assay)
Zona-Binding Assay (ZBA)
In vitro fertilization (IVF)
cervikális termékenyítés (87 anyajuh)

-Ismétlés 4 alkalommal

18. ábra: A 4. számú kísérlet menete

A kísérletben használt ondóplazma protein BARRIOS és mtsai (2000) által közölt módon állítottuk elő.

3.5.1 Sűrűség meghatározása

A sperma sűrűségét az 1/B kísérletben leírt módon határoztam meg. A +15°C-on végzett kísérlet során a motilis, élő spermiumok szelektálására és a szemínális plazma eltávolítására az ALVAREZ és mtsai (1993) által kidolgozott, GARCÍA-LÓPEZ és mtsai (1996) által módosított dextrán/swim-up technikát alkalmaztam (18. ábra).

Reagensek:

➤ Swim-up medium MS (-) (Ca²⁺-mentes):

- ✓ 50nM NaCl
- ✓ 10mM KCl
- ✓ 0,4 mM MgSO₄
- ✓ 0,3 mM K₂HPO₄
- ✓ 21 mM HEPES
- ✓ 2,8 nM glükóz
- ✓ 0,33 mM nátrium-piruvát
- ✓ 18,6 mM nátrium-laktát
- ✓ 200 mM szacharóz

➤ Dextrán oldat: 30 mg/mL dextróz MS (-)

Az MS oldat kémhatását pH=6,5-re kalibráltam. Az ALVAREZ és mtsai (1993) által leírt swim-up médiumhoz nem került CaCl₂ és a NaHCO₃ annak érdekében, hogy ne indukálják a spermiumok idő előtti kapacitációját (GRASA és mtsai, 2004). Ondóvételt követően a begyűjtött mintát úgy homogenizáltam úgy, hogy a spermavételi poharat finoman körkörös irányban mozgattam. Ezt követően a 37°C-ra melegített termosztát belsejében, 500µL spermát pipettáztam egy 15mm átmérőjű, lekerekített aljú, műanyag kémcsőbe, körkörös mozdulatokkal. A spermára 500µL dextrán oldatot (60mg dextrán + 2mL MS (-) rétegeztem, majd erre 1500µL MS (-) médiumot. A mintát függőleges helyzetben 37°C-on inkubáltam 15 percen át, majd eltávolítottam 750µL felülúszót, amit 750µL MS (-) pótoltam. Az inkubációt ezt követően háromszor ismételt meg, így 4 felülúszót gyűjtöttem be. Az első mintát nem használtam fel a kísérletben, mivel ez még nagy számban tartalmaz gyenge minőségű spermiumokat. A három utolsó inkubálás mintáit egy kémcsőbe gyűjtöttem, így a kísérlethez összesen

2,25mL spermamintát használtam fel. Minden kísérletnél két dextranswim-up-ot készítettem, hogy elegendő mennyiségű és koncentrációjú spermaminta álljon rendelkezésre a hűtéshez. Swim-up eljárást követően ismét meghatároztam a spermiumok motilitását, sűrűségét, membránintegritását, kapacitációs státuszát. A foszfatidilszerin transzlokáció mértékét Annexin V- FITC Apoptosis Detection Kit segítségével, az apoptikus markereket Caspase-3 and -7 Detection Kit-el határoztam meg. A DNS fragmentáció mértékét TUNEL módszer segítségével állapítottam meg.

3.5.2 Membránintegritás, mitokondriális membránpotenciál vizsgálata

A spermiumok membránintegritásának és mitokondriális funkciójának vizsgálatához Mitotracker Deep Red-festéket használtam.

Reagensek

- Propídiium-jodid (0,5mg/mL vízben oldva)
- YoPro1 (1mM DMSO-ban oldva) (Invitrogen, Oregon, USA)
- MitoTracker Deep Red (10 μ M DMSO-ban oldva)
- Formalin 0,5% (v/v): (125 μ L 37%-os formaldehid + 10mL H₂O)

A vizsgálathoz a DEL VALLE és mtsai (2012) és MARTINEZ PASTOR és mtsai (2009) által közölt festési technikát alkalmaztam, kisebb módosításokkal. A YoPro-1-et DNS festékként használtam, mely csak azokat a sejteket jelöli, melyek már átestek az apoptózison. A mitokondriális membránpotenciál ($\Delta\psi_m$) értékelését MitoTracker Deep Red festék segítségével végeztem el. Első lépésben az ondómintát 4x10⁶sejt/mL koncentrációra hígítottam PBS oldattal. Ezt követően 2 μ L MitoTracker Deep Red, 2 μ L YoPro1 és 2 μ L propídiium-jodid oldatot pipettáztam a 400 μ L hígított oldathoz. A mintákat szobahőmérsékleten inkubáltam 15 percen keresztül, fénymentes környezetben, majd az oldatot 5 μ L formalinnal 5% (v/v) fixáltam, majd flow citometriás módszerrel értékeltem a mintákat. A YoPro1 emissziójának meghatározásához 525nm-es szűrőt (FL1-detektor), a Mitoracker Deep Red emissziójának meghatározásához 755nm szűrőt (FL5-detektor) használtam, hogy ne alakuljon ki spektrális átfedés. A vizsgálatban 20.000 sejt/minta került értékelésre. A mérési eredményeket HALLAP és mtsai (2005) által leírt módon értékeltem. A szerzők szerint az erős fluoreszcenciával rendelkező sejtek magas mitokondriális membránpotenciállal rendelkeznek. Az értékelésnél négy spermiumpopuláció különíthető el: YoPro-/MitoT- (membránintakt sejtek, alacsony mitokondriális

membránpotenciállal), YoPro-/MitoT+ (intakt sejtek, magas mitokondriális membránpotenciállal), YoPro+/MitoT- (apoptotikus sejtek, melyek sérült plazmamebránnal és alacsony mitokondriális membránpotenciállal rendelkeznek), YoPro+/MitoT+ (sérült plazmamembránnal és magas mitokondriális membránpotenciállal rendelkező sejtek).

3.5.3 Kapacitációs státusz vizsgálata

A kapacitációs státusz meghatározását az 1/B kísérletben leírt módszer alapján végeztem.

3.5.4 Foszfátidilszerin transzlokáció vizsgálata

A foszfátidilszerin transzlokáció, a kapacitáció folyamata során lezajló folyamat, melynek meghatározását Annexin V- FITC Apoptosis Detection Kit és flow citométer segítségével végeztem. Az apoptózis egyik legkorábbi jele a plazmamembránt alkotó foszfátidil szerin (PS) transzlokációja a sejtmembrán belső oldaláról a külsőre. Ennek hatására a PS kötőhelye az Annexin-V számára szabaddá válik, így jelölve az apoptikus sejteket. Az annexin-V-t propídium-jodid festéssel együtt alkalmazva az annexin-V pozitív apoptikus sejtek elkülöníthetővé válnak a propídium-jodid pozitív nekrotikus sejtektől (VERMES és mtsai, 2000). A nekrozis és kései apoptózis során nő a membránpermeabilitás, így a PI be tud jutni a sérült sejtbe, viszont az intakt sejtek membránján nem tud áthatolni. A sejtbe jutott PI keresztükötést alakít ki a DNS bázispárjai között oly módon, hogy egy PI molekula négy, öt bázispárt köt, és fluoreszcenciája 20-30-szorosára növekszik. Az annexin-V és a PI együttes alkalmazásával követhető az apoptózis előrehaladása az élő sejtől, a korai majd késői sejtthalálon át, egészen a sejtpusztulásig.

Reagensek

- Apoptosis Detection Kit (Sigma, Madrid, Spain)
 - ✓ Propídium-jodid (0,5mg/mL vízben oldva)
 - ✓ Annexin V-Cy3.18
 - ✓ 10x Annexin puffer oldat

- Formalin 0,5% (v/v): (125 µL 37%-os formaldehid + 10mL H₂O)

A spermamintákat 300µL-re hígítottam, úgy hogy a sejt koncentráció 4×10^6 sejt/ml legyen. Az oldathoz 1µL Annexin-V festéket és 3µL PI-t pipettáztam, majd 15 percig,

37°C-on inkubáltam. Ezt követően 5µL formaldehiddel fixáltam a sejteket, majd flow citométerrel 20.000 spermiumot értékeltem és kategorizáltam az alábbi négy csoportba:

- 1) **Anx⁻/PI⁻** (élő sejtek, ép plazma membránnal)
- 2) **Anx⁻/PI⁺** (élő sejtek, sérült plazma membránnal)
- 3) **Anx⁺/PI⁻** (kapacitált sejtek, ép plazma membránnal)
- 4) **Anx⁺/PI⁺** (apoptikus/nekrotikus sejtek, sérült plazma membránnal).

3.5.5 Caspase-3, -7 aktivitás meghatározása

Az apoptikus markereket Caspase-3 and -7 Detection Kit és flow citométer alkalmazásával határoztam meg. Az apoptózis a sejthalál egyik formája, melyre a sejtmag- és sejtfragmentációhoz vezet. A folyamat során kis, membránhoz kötött testek alakulnak ki intakt organelumokkal és plazmamembránnal. Az apoptózis terminális szakaszában a proteázok egy új csoportját képező kaszpázok kulcsproteinek aktiválása révén vezetnek a sejt halálához. A proenzim egy proteolitikus hasítás révén aktiválódik. Az effektor kaszpázokat vagy aktív iniciátor kaszpázok, vagy a citotoxikus T-sejtek által a célsejtbe juttatott granzyme-B enzimek, vagy Ca²⁺-aktivált proteolitikus enzimek, az úgynevezett kalpainok aktiválják (kaspáz-kaskád). A kaszpáz-3, -7 effektor kaszpázok képesek a sejt fehérjéinek hasítására, proteolízisére (RUST és mtsai, 2000).

Reagensek

- ETDH₁, 1,167mM
- FAM Caspase-3 and -7 Assay Kit (Invitrogen)
- PBS 1x

A spermamintát 300 μ L-re hígítottam (3×10^6 sperma/mL), ehhez 3 μ L FAM-Peptide-FMK reagenst adtam, majd a mintát 37°C-on, 5% CO₂ tartalom mellett, sötétben inkubáltam 60 percig. Ezt követően a mintát kétszer mostam 100 μ L washing bufferrel (a FAM Caspase-3 and -7 Assay Kit-ben található oldat). Az első és a második mosás előtt az oldatot 600 rpm sebességgel 8 percig centrifugáltam szobahőmérsékleten. A második centrifugálást követően a felülúszót eltávolítottam és a visszamaradó pelletet 500 μ L washing bufferrel hígítottam, amihez 2 μ L ETDH₁-et adtam. A mintát 10 percig szobahőmérsékleten inkubáltam, majd flow citométerrel 20.000 sejtet értékeltem. A módszer alkalmazásával az alábbi négy szubpopulációt különböztettem meg:

- 1) **Casp-/Eth-** (nem apoptikus sejtek)
- 2) **Casp+/Eth-** (kaspáz-3, -7 aktivitást mutató sejtek)
- 3) **Casp+/Eth+** (elhalt sejtek, melyek kaspáz aktivitást mutatnak)
- 4) **Casp-/Eth+** (elhalt sejtek, kaspáz aktivitás nélkül)

3.5.6 DNS fragmentáció mértékének meghatározása

A DNS fragmentáció mértékét TUNEL-teszt (terminal transferase mediated dUDP nick end-labeling) segítségével határoztam meg. A Tunel-festés egy speciális módszer apoptotikus sejthalál detektálására és kvantifikálására. Az apoptózis jellegzetessége a kromatin állomány kondenzációja és a DNS feldarabolódása. A DNS fragmentációjában kiemelkedő szerepet játszik a kaspáz aktivált DN-áz, a CAD (caspase activated DNA-se). Az intakt sejtben ezt az ICAD inhibitor (inhibitor of CAD) tartja inaktív állapotban. A kaspáz kaszkád aktiválódásakor az effektor kaspáz-3 elhasítja az ICAD fehérjét, amely ezt követően leválik a CAD molekuláról, így az tovább aktiválódik, beáramlik a nukleuszba és ott a DNS szálból kivágja az internukleoszomális szakaszokat, ami a kromatin állomány nukleoszomális méretű feldarabolódásához vezet. A Tunel reakció során az apoptózis során képződő szabad 3'-OH DNS végek fluoreszcensen jelölődnek, ezáltal detektálhatók.

A pusztuló sejt magja azért azonosítható mikroszkóp segítségével, mert az eljárás során a fragmentált DNS helyén barna színű csapadék képződik.

Reagensek

- In Situ Cell Detection Kit with fluorescein isothiocyanate (FITC)-labelled dUTP (Roche, Mannheim, Germany)
- PBS 1x
- Permeabilizációs oldat: 0,1% Tritón X-100, 0,1%-os nátrium-citrát oldat
- Dezoxiribonukleáz oldat: 20 U.I. DNáz 100μL Tris HCL 50mM, pH=7,5 és 1mg/mL BSA
- Fixáló: 4% (v/v) paraformaldehidet tartalmazó PBS oldat (PFA)
- ETDH₁ (etidium-homodimer): 23,3μM ETDH₁:97,67μL H₂O + 2,33μL ETDH₁ 1Mm

A spermamintát 500μL-re hígítottam (4×10^7 spermasejt/mL), majd a 4%-os PFA-val fixáltam a sejteket egy órán keresztül, szobahőmérsékleten. Ezt követően a mintákat kétszer mostam 100μL PBS-el. A mosások között az oldatot 8 percig 3200rpm sebességgel centrifugáltam és a felülúszót eltávolítottam. Második centrifugálást követően a felülúszót 100μL permeabilizációs oldattal pótoltam. A mintát ezt követően 2 percig +4°C-on inkubáltam, majd ismét két mosást végeztem. A felülúszó eltávolítása után a pelletet 50μL labelin oldattal hígítottam, ami TdT és dUTP enzimet tartalmaz. A mintát ezt követően egy óráig, sötétben, 37°C-on inkubáltam. Ezt két PBS-mosás követte, melyek között az oldatot 600rpm sebességgel centrifugáltuk 10 percen keresztül. A második mosást követően eltávolítottuk a felülúszót, amit 300μL PBS-el pótolunk, amihez 2μL Ethd-t adunk. A spermát flow citométer segítségével értékeltük (20.000 sejt/minta).

Az értékelésnél az alábbi kategóriákat különíthetők el:

Tunel-: intakt DNS

Tunel+: fragmentált DNS

3.5.7 A hűtés folyamata

A spermaminták hígítását +30°C-on végeztem el, majd ezt követően a hűtéshez használt csöveket parafilmmel fedtem le és a +30°C-os vízfürdőbe helyeztem, majd a mintákat +15°C-ra hűtöttem. A hűtési folyamat végén a hígított ejakulátumot

hűtőkamrában tároltam +15°C-on további 30 percen át, majd elvégeztem a minták értékelését.

A második kísérletben a mintákat +5°C-ra hűtöttem le, majd a +5°C-os hűtőkamrába helyeztem. Ezt követően a hígított ondóból 0, 24, 48h elteltével mintát vettem, majd meghatároztam a friss spermánál is értékelt paramétereiket.

3.5.8 Peteburok kötődési teszt (ZBA-assay) a fertilitás meghatározására

A peteburok kötődési teszt a spermiumok funkcionális jellemzésére szolgáló módszer, melynek során a hímivarsejtek a petesejtet körülvevő burok (zona pellucida) ZP3 fehérjéjéhez kapcsolódnak.

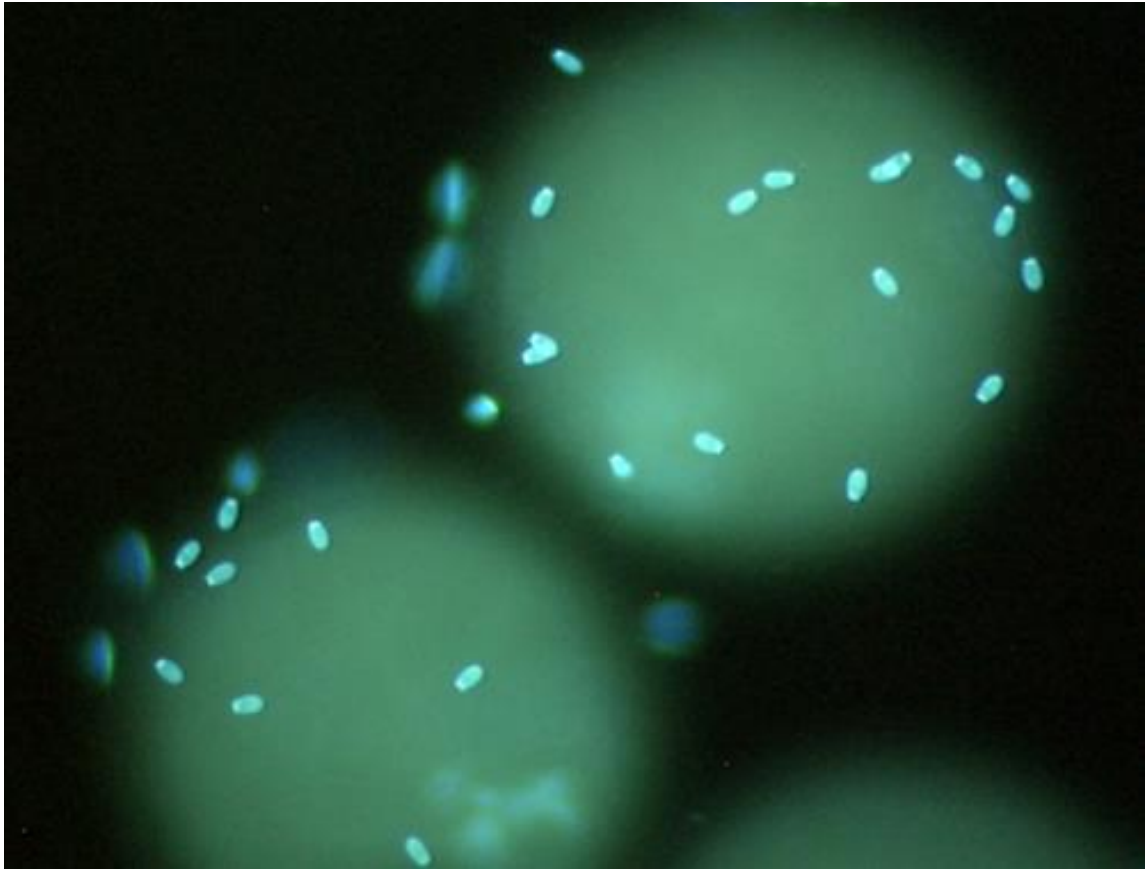
Reagensek

Fertilizációs médium:

- Synthetic Oviductal Fluid glükózzal kiegészítve (TERVIT és mtsai,1972)
- 2% (v/v) oestrus sheep serum
- 10µg/mL heparin
- 1µg/mL hypotaurin

A kísérletben vágóhídról származó juh petesejteket használtunk, amelyeket fiziológias sóoldatban, szobahőmérsékleten szállítottuk a laboratóriumba. A petefészkeket PBS-el mostuk, majd felhasználásig -20°C-on tároltuk (PÉREZ-PÉ és mtsai, 2000). A felhasználás napján a petefészkeket szobahőmérsékleten felolvasztottuk és PBS-sel mostuk. A petesejteket WANI és mtsai (2000) módszerével a petefészkek feldarabolása és hasogatása után gyűjtöttük be. A kumulusz sejteket nem tartalmazó és zona pellucida intakt sejteket különválogattuk és Petri-csészében tároltuk 400µL fertilizációs médium hozzáadását követően. A petesejteket felhasználásig 39°C-on tartottuk CO₂ (5%) termosztátban. A spermakonzentrációt 5x10⁵ sperma/ml-re hígítottuk a fertilizációs médiummal, majd hozzáadtuk a petesejtekhez és paraffin olajjal fedtük. Ezt követően CO₂ termosztátban inkubáltuk a sejteket 39°C-on 1,5h-án keresztül. Inkubációt követően a petesejteket HEPES-TCM médiumba pipettáztuk át, hogy a nem kötődő spermiumokat eltávolítsuk (IVANOVA és MOLLOVA, 1993). Ezt követően a petesejteket glutáraldehiddel (1,5%) fixáltuk 15 percen keresztül, majd Hoechst 33342 (1µg/mL) festettük 15 percen át 37°C-on. Tárgylemezenként 4-5 petesejtet értékeltünk Nikon Eclipse E-400 mikroszkóp segítségével 400x nagyítás

mellett. Az értékelésnél megszámoltuk a zona pellucidához kapcsolódó spermiumok számát (19. ábra).



19. ábra: A zona pellucidához kötődő spermiumok Hoechst 33342 fluoreszcens festést követően

(Forrás: BIOZAR's Group, Department of Biochemistry and Molecular and Cell Biology of the University of Zaragoza)

3.5.9 In-vitro fertilizáció (IVF)

A petesejtek ivaréretlen *rasa aragonesa* jerkéktől kerültek begyűjtésre vágóhídról. A petesejteket PBS oldatban tárolták 37°C-on, amit 100 IU/mL penicillin-G és 100 µg/mL streptomycin szulfáttal egészítettünk ki. Az IVF-hez használt vegyszerek a Sigma-Aldrich Co.-tól lettek beszerezve. A petesejteket a petefészek feldarabolása után tüvel és fecskendővel gyűjtöttük be (WANI és mtsai, 2000) Petri-csészébe, ami a következő tápfolyadékot tartalmazta (Hepes-buffered TCM-199, 0,1% polivinil alkohol, 0,04% nátrium-bikarbonát, 25IU/mL heparin, 100IU/mL penicillin-G és 100µg/mL sztreptomicin szulfáttal kiegészítve). WANI és mtsai (2000) által leírt módszer szerint kategorizáltuk a petesejteket a kumulusz sejtek és a citoplazma állapota szerint.

Csak azokat a petesejteket értékeltük in vitro, amelyek több réteg kumulusz sejtet tartalmaztak, és egységes citoplazmával rendelkeztek. A kiválasztott petesejtek egy maturációs médiumba kerültek, ami 10% (v/v) estrus sheep szérumot tartalmazó bicarbonate buffered TCM-199, 10µg/mL FSH-t és LH-t, 100µM ciszteinamint, 0,3mM nátrium piruvátot, 100IU/mL penicillin-G-t és 100µg/mL sztreptomycin szulfátot tartalmazott. A mintákat paraffin olajjal fedtük és 24 órán keresztül 39°C-on 5% CO₂ tartalom mellett inkubáltuk. Az inkubáció végén a petesejteket megszabadítottuk a kumulusz sejtektől és áthelyeztük a fertilizációs médiumba (TERVIT és WHITTINGHAM, 1972), 2% (v/v) oestrus sheep szérummal kiegészítve, 10µg/mL heparin, 1µg/mL hipotaurin. A fertilizáció napján a +5°C-on hűtött, 24h-át tárolt spermiumokat swim-up eljárás segítségével szelektáltuk és hozzáadtuk a petesejtekhez. A 350µL fertilizációs médiumban lévő spermiumok végső koncentrációja 1x10⁶ spermium/mL. Az oldatot paraffin olajjal fedtük le és 24 órán át 39°C-on inkubáltuk 5% CO₂ tartalom mellett. 24 és 36 órát követően a mintákat megnéztük, hogy megfigyelhető-e az osztódás. A nem fejlődő petesejteket sztereomikroszkóp segítségével figyeltük meg, hogy hol állnak az érési folyamatban. Azok a petesejtek melyek sarki testet is tartalmaztak, érettnek minősültek, ami kettőt tartalmazott az termékenyítettnek minősült, de nem osztódott. A maturációs, termékenyülési és osztódási rátát a petesejtek osztódási állapota (1 vagy több sarki test, petesejt osztódása) alapján számoltuk ki.

3.5.10 Transzcervikális termékenyítés

A 15°C-ra hűtött 25µg/mL-es protein tartalmú és kontroll spermamintákat három alkalommal használtuk fel mesterséges termékenyítésre. A termékenyítéshez alkalmanként 30 rasa aragonesa anyajuh ivarzásszinkronizálását végeztük el. Az ivarzás-szinkronizáció az alábbiak szerint történt. A szinkronizálást Chronogest hüvelyszivacs (Intervet International, Boxmeer, Netherlands) behelyezésével végeztük el, ami 40mg fluorogestone acetate-ot tartalmazott. A hüvelyszivacsokat a behelyezéstől számított 12. napon távolítottuk el, majd 400IU eCG-t (Folligon International, Boxmeer, Netherlands) adtunk az ovuláció kiváltása érdekében. Az ivarzásszinkronizálások során 6 anyajuh vesztette el a hüvelyszivacsot, de ezek az egyedek is kaptak Folligon injekciót és részt vettek a kísérletben. Az első termékenyítés során két anyajuh, a harmadik termékenyítés során egy anyajuh nem került be a

kísérletbe. Ennek oka, hogy az anyajuhok vaginájában nagy mennyiségű, fehér színű hüvelyváladék gyűlt fel, és cervixük nyálkahártyáján pontszerű bevérzések voltak.

Az inszeminálásra a Folligon injekció beadásától számított 48h-ban került sor, a beondozást egy alkalommal végeztük el. A termékenyítés sikerességének megállapítását az inszeminációtól számított 34. napon végeztük el, ultrahangos vemhességvizsgálat segítségével.

3.5.11 Flow citométer

A zaragozai spermaminták elemzéséhez Beckman Coulter FC 500 (IZASA, Barcelona, Spain) flow citométert és CXP szoftvert használtunk. A citométer két lézert tartalmazott (Argon ion lézer 488 nm és solid state laser 633 nm) és 5 filtert az adszorbancia detektálására (FL1-525, FL2-575, FL3-610, FL4-675 és FL5-755 \pm 5nm-es sávszűrővel). Minden mérésnél minimum 20.000 sejt számlálására került sor. A sperm populáció kapuzása a specific forward (FS) és side scatter (SS) tulajdonságok alapján történt, úgy hogy a nem spermium események kizárásra kerültek. Az áramlási sebesség 200 sejt/sec-ra lett beállítva.

A Debreceni Egyetem Biofizika Intézetében lévő BD FACSCalibur flow citométer segítségével értékeltük. Minden mérésnél minimum 20.000 sejt számlálására került sor. A sperm populáció kapuzása a specific forward (FS) és side scatter (SS) tulajdonságok alapján történt, úgy hogy a nem spermium események kizárásra kerültek. Az áramlási sebesség 200 sejt/sec-ra lett beállítva.

3.5.12 Statisztikai értékelés

Az adatok feldolgozását és a statisztikai elemzéseket az SPSS 13.0 programcsomag segítségével végeztük.

A Dr.Oetker zselatinnal végzett kísérlet elvégzésére egy alkalommal került sor, ezért az eredmények statisztikai értékelését nem végeztük el.

A szódium alginát kezelés hatását a +15°C-os tárolás során egytényezős varianciaanalízis (one-way ANOVA) segítségével végeztük el. A varianciaanalízis során Tukey post hoc tesztet futtattunk le 5%-os szignifikancia szinten. A +5°C-on tárolt minták esetén a GLM modell alkalmazásával határoztuk meg, hogyan befolyásolta a zselatin koncentráció és a tárolás ideje az ondó motilitását, membránintegritását és az apoptikus sejtek arányát.

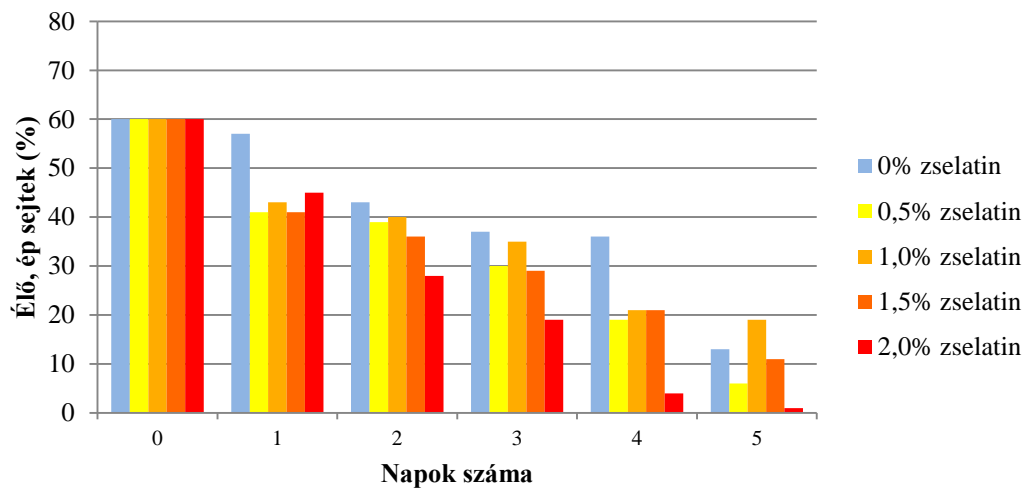
A második kísérletben a vér szeléntartalmának változását GLM módszer segítségével határoztuk meg, a 0. napot kovariánsként használva. A kezelés hatását a spermaminőségi tulajdonságokra GLM modell alkalmazásával határoztuk meg. A varianciaanalízis során Tukey post hoc tesztet futtattunk le 5%-os szignifikancia szinten.

A harmadik kísérletben a szezon hatását varianciaanalízis (one-way ANOVA) segítségével végeztük el. A varianciaanalízis során Tukey post hoc tesztet futtattunk le 5%-os szignifikancia szinten.

A negyedik kísérletben a hígítók és a tárolás idejének hatását GLM módszer segítségével határoztuk meg, míg a peteburok kötődési teszt és az in vitro fertilizáció során elért eredményeket egytényezős varianciaanalízis (one-way ANOVA) segítségével. A varianciaanalízis során Tukey post hoc tesztet futtattunk le 5%-os szignifikancia szinten.

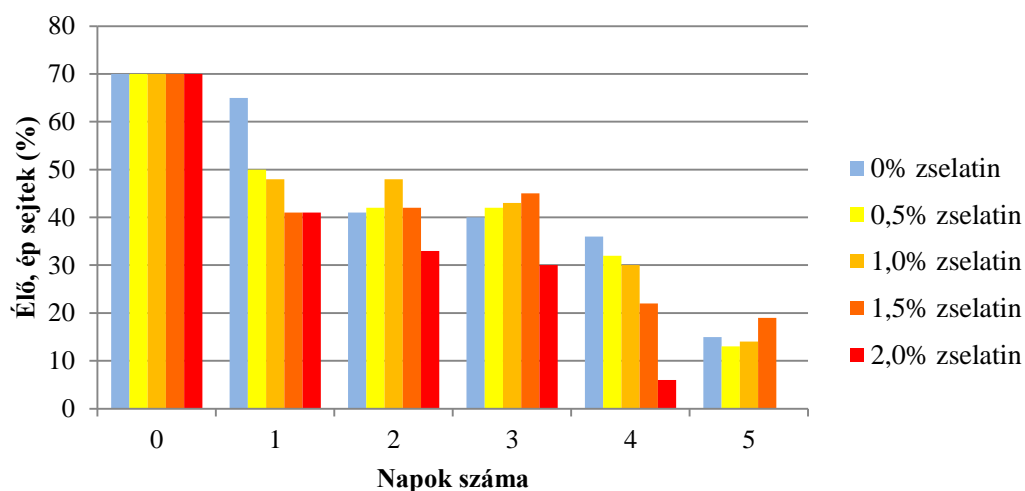
4 EREDMÉNYEK

4.1 1/A kísérlet: Kos sperma eltartása zselatinos hígítóban +5°C és +15°C-on



20. ábra: Az 1,5%-os zsírtartalmú UHT-tej +zselatin tartalmú hígítóban az élő, ép sejtek %-os aránya az ötnapos tárolás során, +5°C-on

Ahogy a grafikonon is látható a tárolás negyedik napjáig a kontroll hígítóban volt a legtöbb élő, ép sejt. Az ötödik napon drasztikusan csökkenést tapasztaltunk az ép sejtek arányában minden hígító esetében. Az eredmények alapján megállapítható, hogy a 1,5%-os zsírtartalmú UHT-tej + zselatin tartalmú hígítók közül az 1% zselatint tartalmazóban őrizték meg a sejtek legtovább az épségüket (20. ábra). A +5°C-ra hűtött termékenyítőanyagot a hűtéstől számított 48h-án belül ajánlott felhasználni. Az első két tárolási nap során egyedül a 2,0% zselatin tartalmú hígítóban volt alacsony az ép sejtek száma a többi hígítóban megfelelőek voltak az értékek. Ennek alapján levonható a következtetés, hogy a zselatin kiegészítés nem ártalmas a spermiumokra, de a kontroll tejes hígító által elért eredményeket nem képes felülmúlni.



21. ábra: Az 1,5%-os zsírtartalmú UHT-tej+5% tojássárgája +zselatin tartalmú hígítóban az élő, ép sejtek %-os aránya az ötnapos tárolás során, +5°C-on

Az 5%-os tojássárgája kiegészítés hatására a tárolás első napján a kontroll, míg a második és harmadik napon a zselatin tartalmú hígítóban maradtak nagyobb arányban maradtak életben a sejtek (21. ábra). Ebből arra következtethetünk, hogy a tojássárgájában lévő proteinek, lipidek nem mutatnak összeférhetlenséget a zselatinnal. A tojássárgáját is tartalmazó hígítóban a zselatinok membránvédő hatása jobban érvényesül, mint a tej alapú hígítóban, egyedül az UHT tej+5% tojássárgája+2% zselatin tartalmú hígítónak volt kedvezőtlen hatása, mivel a tárolás ötödik napján már nem volt élő, ép sejt a vizsgált mintában.

A vizsgált mintákban élő farkú-elhalt fejű, illetve élő-sérült akroszómával rendelkező sejtek kis számban fordultak elő. Az eredmények alapján levonható a következtetés, hogy az öt napig tartó, +5°C-on végzett tárolás során az 1,0-1,5% zselatint tartalmazó tejes és tej+tojássárgájás hígítóban a kossperma minták élő, ép sejtjeinek aránya megfelelő volt.

1/B kísérlet: A különböző alginát koncentráció hatása a +15°C-ra hűtött spermánál

3. táblázat: A különböző nátrium-alginát koncentráció hatása a kossperma vizsgált jellemzőire, +15°C-ra hűtést követően

Vizsgált jellemzők	nátrium-alginát tartalom (%)			
	0	1,0	1,5	2,0
(%)	X±SD	X±SD	X±SD	X±SD
Motilitás	48,75±37,16	50,00±32,81	51,00±31,09	54,50±28,59
Progresszív motilitás	25,75±22,95	21,50±19,43	25,50±20,87	25,75±13,88
CFDA⁺/PI⁻	47,50±5,06	51,25±2,21	55,00±13,51	50,25±10,34
NCL	21,25±10,30	21,00±8,67	21,50±8,18	17,00±5,35
NCD	13,00±5,35	16,00±5,65	12,75±4,19	11,75±7,54
CL	29,50±11,47	31,75±13,45	26,25±4,11	28,00±12,54
CD	31,00±12,90	28,25±13,22	33,25±5,50	24,50±14,28
R	5,25±3,59	3,00±2,44	6,25±4,03	10,00±8,52
Anx⁻/CFDA⁺	39,25±6,07	42,50±4,65	43,25±10,04	44,25±7,63
Anx⁺/CFDA⁺	24,50±4,65	29,00±2,16	30,50±7,76	26,75±5,12
Anx⁺/CFDA⁻	36,25±4,99	28,50±5,19	26,25±4,99	29,00±3,91

(P>0,05)

Az alginát tartalmú hígítókból a sejtek motilitása hasonló volt a kontrollhoz. A +15°C-ra hűtött minták közül a 1,5%-os szódium-alginát koncentrációjú mintában volt a legmagasabb a membránintakt sejtek száma, míg a legalacsonyabb értéket a kontroll hígítónál tapasztaltuk (P>0,05). A nem kapacitált, élő sejtek száma a minták esetében közel azonos volt (3. táblázat).

A kossperma 48h-át való eltartása nátrium-alginát tartalmú hígítóban,+5°C-on

4. táblázat: A nátrium-alginát tartalmú hígítóban tárolt sperma motilitás változása 48h-ás tárolás során

Vizsgált jellemzők	nátrium-alginát tartalom	Eltartás ideje		
		0h	24h	48h
(%)	(%)	X±SD	X±SD	X±SD
Motilitás	0	62,00±23,00 ^a	76,00±2,08 ^a	71,00±5,56 ^a
	1,0	28,00±4,58 ^b	47,00±16,82 ^b	40,00±26,15 ^b
	1,5	13,00±7,00 ^c	19,33±7,76 ^c	19,66±14,84 ^c
	2,0	16,66±9,07 ^c	15,66±2,08 ^c	14,00±1,00 ^c
Progresszív motilitás	0	39,66±21,50 ^a	43,00±7,81 ^a	38,66±8,32 ^a
	1,0	16,66±2,08 ^b	29,33±14,29 ^b	23,66±21,19 ^b
	1,5	3,00±5,19 ^c	3,33±4,04 ^c	7,66±8,32 ^c
	2,0	6,00±5,29 ^c	2,00±1,00 ^c	1,33±0,57 ^c

^{a, b, c} - a különböző betűvel jelölt átlagok szignifikáns (P<0,05) különbségeket mutatnak azonos vizsgálati időpont esetében

A nátrium-algináttal kezelt minták esetében a legalacsonyabb motilitási értékeket a 1,5% és 2,0% szódium-alginát kiegészítés esetében tapasztaltuk (4. táblázat). A 24h-ban tapasztalt motilitás emelkedése annak tudható be, hogy az ISAS program frissítésre került, és az értékeléshez használt kamerát lecserélték. A program és a műszerel cseréje okozhatott olyan értékelőtőlódást, amely magyarázatot ad a 24h-ban tapasztalt motilitás emelkedésére. A nátrium-alginát viszkózus anyag, mely jó vízmegkötő képességgel rendelkezik. A magas viszkozitás azonban negatívan befolyásolja a spermasejtek motilitását, amiről HIRAI és mtsai (1997) már korábban beszámoltak. Összességében a motilitás csökkenése a zselatinnal végzett eltartási próba során kedvező tulajdonság lenne. A spermasejtek mozgása, mint aktív folyamat lejátszódása során fokozódik a hígítóban a szabadgyökök koncentrációja, amely károsítja az ondósejtek membránszerkezetét, ezáltal csökkentve azok fertilizációs képességét. Amennyiben a zselatin csökkenti a sejtek mozgását, glükolízis mértékét, úgy a hígítóban lévő cukrok hosszabb ideig biztosíthatnák a spermiumok mozgásához szükséges energiát (ESBENSHADE és NEBEL, 1990). A szódium-alginát 37°C-on gélből folyékony halmazállapotúvá válik, ami egyben azt is jelenti, hogy inszeminációt követően a cervixben vagy az uterusban a spermasejtek mozgását nem korlátozza a nagy

viszkozitás és a hígítóban lévő tápanyagokat is rendelkezésükre állnak a mozgási energia biztosításához. CORCINI és mtsai (2011) kan, míg LÓPEZ-GATIUS és mtsai (2005) nyúl sperma esetében hasonló motilitási értékeket kaptak az ondó hűtve tárolása során.

5. táblázat: A +5°C-on tárolt kossperma membránintegritása

Vizsgált jellemzők	nátrium-alginát tartalom	Eltartás ideje		
		0h	24h	48h
(%)	(%)	X±SD	X±SD	X±SD
CFDA⁺/PI	0	64,66±2,51 ^a	70,00±10,44 ^a	63,00±5,56 ^a
	1	60,33±6,80 ^b	52,00±10,44 ^b	57,00±8,88 ^b
	1,5	56,33±1,52 ^b	54,00±3,46 ^b	53,33±9,71 ^b
	2,0	48,33±4,61 ^b	54,00±12,52 ^b	53,00±6,55 ^b

^{a, b} - a különböző betűvel jelölt átlagok szignifikáns (P<0,05) különbségeket mutatnak azonos vizsgálati időpont esetében

A motilitáshoz hasonlóan a membránintegritás vizsgálatánál is különbséget tapasztaltunk a kontroll és a zselatin tartalmú hígítók között. Mind a három vizsgált időpontban a kontroll hígítóban volt a legtöbb membránintakt sejt. A zselatin koncentráció növekedésével fokozatosan csökkent az ép membránnal rendelkező sejtek aránya (5. táblázat). COCINI és mtsai (2011) kan sperma esetében azt tapasztalták, hogy zselatin kiegészítés hatására a tárolás első napján csökkent a legnagyobb mértékben az ép sejtek aránya, ezt követően a négy napos tárolás során nem változott érdemben az intakt sejtek aránya a hígítóban. A motilitás és a membránintegritás vizsgálata során enyhe agglutinációt tapasztaltunk a 1,5 és 2,0% szódium-alginátot tartalmazó mintáknál. A sperma agglutináció azért jelent problémát, mert az agglutinált sejtek körül csökken a pH. A pH csökkenés azzal magyarázható, hogy a sejtek anyagcsereterméke feldúsul környezetükben, ami toxikus lehet az élő sejtek számára, ezáltal csökkentve viabilitásukat. CORTELL és CASTRO (2008) fagyasztott nyúl sperma esetében azt tapasztalták, hogy a zselatin kiegészítés nem volt hatással a spermiumok motilitására és az élő sejtek számára sem.

6. táblázat: A kapacitációs státusz vizsgálata a 48 órán át tárolt ondónál

Vizsgált jellemzők	nátrium-alginát tartalom	Eltartás ideje		
		0h	24h	48h
(%)	(%)	X±SD	X±SD	X±SD
NCL	0	45,33±3,51	42,33±9,81	27,00±6,08
	1	47,66±3,51	36,33±9,60	23,33±2,08
	1,5	41,00±8,54	39,00±8,66	28,33±10,69
	2,0	44,33±8,96	37,33±7,02	35,00±10,81
NCD	0	9,33±5,13	2,00±2,00	5,00±4,58
	1	13,00±2,64	4,33±2,51	1,33±10,01
	1,5	9,33±6,42	10,00±12,28	15,33±2,30
	2,0	3,33±1,15	6,66±1,15	11,66±1,19
CL	0	23,66±3,21	21,33±13,31	34,66±9,45
	1	21,66±3,51	32,00±6,08	29,33±13,86
	1,5	25,00±10,81	25,66±11,50	29,00±16,46
	2,0	17,33±11,71	31,00±11,78	25,33±3,05
CD	0	10,66±4,93	16,33±12,66	12,33±5,50
	1	9,33±11,01	14,33±7,09	21,66±3,51
	1,5	14,00±11,53	16,33±10,21	14,00±2,00
	2,0	14,33±20,03	15,00±2,64	16,66±2,08
R	0	10,66±4,93	16,33±12,66	13,33±5,50
	1	7,66±3,21	13,00±7,54	15,33±7,76
	1,5	10,66±7,57	9,00±7,93	13,33±4,16
	2,0	17,66±7,50	4,00±2,00	11,33±11,01

(P>0,05)

NCL-ép akroszóma membránú, élő sejt; NCD-ép akroszóma membránú, elhalt sejt; CL-kapacitált, élő sejt; CD-kapacitált, elhalt sejt; R- akroszómareakción átesett sejt

A kapacitációs státusz vizsgálata során nem tapasztaltunk érdemi különbséget a CTC-vizsgálat során értékelt kategóriák és az alkalmazott hígító zselatin koncentrációja között. A 48h-ban a 2,0% zselatin tartalmú hígítónál volt a legtöbb nem kapacitált, élő sejt (6. táblázat). A jelenséget magyarázhatja a DUBÉ és mtsai (2004) munkájában olvasható elmélet. A szerzők véleménye, hogy a zselatinok védő funkciója nem a hígító viszkozitásának növelésével magyarázható, hanem a magas protein tartalmukkal,

melyek képesek megvédeni a spermamembránt a szabadgyökök, hidegsokk káros hatásától.

7. táblázat: A foszfátidilszerin transzlokáció vizsgálata a 48h-án át tárolt spermánál

Vizsgált jellemzők	nátrium-alginát tartalom	Eltartás ideje		
		0h	24h	48h
(%)	(%)	X±SD	X±SD	X±SD
Anx⁻/CFDA⁺	0	47,34±6,65	38,66±8,50	40,33±9,01
	1	44,33±13,86	35,33±6,50	38,33±11,59
	1,5	48,33±9,29	39,66±11,50	41,00±19,00
	2,0	40,33±15,88	31,00±4,35	33,00±10,9
Anx⁺/CFDA⁺	0	27,66±8,32	23,00±6,92	22,33±10,69
	1	29,66±17,55	33,66±6,65	18,66±7,63
	1,5	29,33±15,01	28,00±7,81	19,33±4,50
	2,0	32,33±16,92	31,66±5,03	30,66±7,23
Anx⁺/CFDA⁻	0	28,00±5,56	38,33±11,15	37,33±6,35
	1	25,33±4,93	31,00±12,49	43,00±4,00
	1,5	22,33±7,23	32,33±9,60	39,66±14,57
	2,0	27,33±5,50	37,33±7,37	36,33±16,80

(P>0,05)

A foszfátidilszerin transzlokáció vizsgálata során nem tapasztaltunk szignifikáns különbséget a kontroll és a zselatin tartalmú hígítók között a különböző vizsgálati csoportok esetében (P>0,05). A 48h-ás tárolás során minden hígítónál azonos mértékben csökkent a nem apoptikus, élő sejtek aránya. Az apoptikus sejtek számában azonban különbség tapasztalható a különböző médiumok között. 2,0% szódium-alginát kiegészítés növelte a legnagyobb mértékben az apoptikus sejtek számát, míg 1,0% szódium-alginát koncentráció esetén ez az érték alacsonyabb (7. táblázat). Ahogy már a korábbiakban is említettük a 1,5% és 2,0% szódium-alginát tartalmú hígítók esetében agglutinációt tapasztaltunk. Az agglutinált sejteknél valószínűsíthetően megindult a Ca²⁺ kiáramlása. Az agglutinált sejtek körül megnövekedett Ca²⁺ koncentráció okozhatja az apoptikus folyamatok beindulását az élősejtek esetében.

4.2 Szelénes takarmány kiegészítés hatása a spermatermelésre, vér szeléntartalmára és az ondóplazma fehérjeösszetételére

8. táblázat: Fehér dorper kosok spermaminőségének alakulása szelénes takarmány kiegészítés hatására

Vizsgált jellemzők	Csoport	A spermavétel időpontja (nap)						
		0	42	49	56	63	70	86
		X±SD	X±SD	X±SD	X±SD	X±SD	X±SD	X±SD
Mennyiség (mL)	Se (n=6)	1,53±0,57 ^a	1,75±0,35 ^a	1,21±0,60	1,56±0,36	1,61±0,60	1,41±0,51	1,71±0,35
	K (n=6)	1,06±0,51 ^b	1,43±0,56 ^b	1,36±0,47	1,36±0,39	1,57±0,55	1,36±0,57	1,75±0,37
Sűrűség (x10 ⁹)	Se (n=6)	4,62±2,03	3,32±1,59	4,04±1,22	3,73±0,74	1,42±0,73 ^a	3,66±1,47	2,61±0,78
	K (n=6)	4,31±1,57	3,41±1,43	4,12±1,47	3,93±0,92	2,63±1,94 ^b	3,46±1,46	2,78±0,81
Tömegmozgás (0-5M)	Se (n=6)	4,40±1,00	4,00±2,00	3,71±1,10	4,10±1,03	4,54±0,88 ^a	3,66±1,65	4,19±2,17 ^a
	K (n=6)	3,83±1,00	4,00±1,00	3,47±0,90	4,33±0,81	3,83±0,92 ^b	4,09±1,11	3,26±2,40 ^b
Progresszív motilitás (%)	Se (n=6)	66,66±10,32	55,00±20,73	50,83±13,93	56,66±11,69	71,66±9,83 ^a	49,16±29,35	59,16±28,00 ^a
	K (n=6)	53,33±20,09	55,83±11,14	48,33±8,75	62,50±7,58	53,33±18,61 ^b	55,83±14,97	44,16±29,90 ^b
PI-/SYBR14 (%)	Se (n=6)	78,74±8,67	72,20±6,84	57,38±19,64	67,67±14,25	87,18±8,85	85,05±9,28	89,03±8,22
	K (n=6)	81,76±7,91	83,40±9,90	59,75±8,42	73,67±8,42	87,25±8,97	80,30±15,82	88,29±3,46
Herekörméret (cm)	Se (n=6)	35,29±1,76	35,41±1,62	32,25±2,42	32,87±1,72	32,87±2,18	32,54±2,18	32,33±2,74
	K (n=6)	34,58±1,90	35,00±1,26	32,41±2,97	32,41±1,46	32,08±2,20	33,75±1,99	31,08±2,36

^{a, b} - a különböző betűvel jelölt átlagok szignifikáns (P<0,05) különbségeket mutatnak azonos vizsgálati időpont esetében

A nanoszelénnel végzett kísérlet estén a nulladik napon tapasztalt szignifikáns különbség a sperma mennyiségében nem a kezelés hatásának tulajdonítható. Mivel csoportonként 6 kos vett részt a vizsgálatban (ami a statisztikai értékelés követelményeinek megfelel, de alacsony elemszám), ezért egy-egy kos eredményei is jelentősen módosították az eredményeket. A takarmánykiegészítés hatására a 42. kezelési napon tapasztaltunk szignifikáns különbséget (P<0,05) a szelénes és a kontroll csoport sperma mennyiségében. A további napokon nem volt hatása a szelénnek a

mennyiségre, de megállapítható, hogy a kísérlet végére mindkét csoportban nőtt a sperma mennyisége. A sperma sűrűségében a 63. napon volt egy markáns növekedés a kontroll csoportban. Összességében azt tapasztaltuk, hogy a kísérlet ideje alatt a sperma sűrűsége mind két csoport esetében csökkent. A spermiumok tömegmozgása és progresszív motilitása a szelén csoportnál volt jobb a 63. és a 86. napon egyaránt (8. táblázat). A sűrűség, tömegmozgás, progresszív motilitás növekedését azzal tudom magyarázni, hogy a 63. napon már a kezelés hatását lehet látni az eredményeken. Kosnál a kezelés hatása a spermiogenezis idejét figyelembe véve (54 nap + 10-14 nap érés a mellékherében) a kezelés 60. napja körül várható, mert ekkor az ejakulátumban már azok a sejtek vannak jelen, amik a kezelés ideje alatt keletkeztek. Az élő sejtek számában és a herekörméret változásában nem volt szignifikáns különbség a vizsgált időszak során.

KENDALL és mtsai (2000) kosbárányok esetében vizsgálták a szelén és cink takarmánykiegészítés hatását a spermaminőségre és a vér elemtartalmának változására. Az eredményeik azt mutatták, hogy a kezelésnek nem volt hatása a spermatokrit értékre és az ondó mennyiségére, viszont szelén kiegészítés hatására növekedett a membránintakt sejtek száma a kontroll mintához viszonyítva.

9. táblázat: A vér szeléntartalma (ppb) a kísérlet különböző időpontjaiban

	Vérvétel időpontja (nap)				
	0	42	56	70	86
Csoport	X±SD	X±SD	X±SD	X±SD	X±SD
Szelénés (ppb) (n=6)	154,66±31,24	168,10±132,09	120,06±52,88	161,25±62,78	171,87±31,32
Kontroll (ppb) (n=6)	143,16±41,60	129,35±53,07	99,94±6,78	95,038±20,60	113,41±31,16

(P>0,05)

A kísérlet során nem tapasztaltunk szignifikáns különbséget a kontroll és a kezelt csoport vér szeléntartalmában a különböző időpontokban (P>0,05) (9. táblázat). Mivel a kísérleti csoportokban 6-6 kos vett részt, ezért az egyedi szórások nagymértékben

móssították az eredményeket. A kísérlet 70. és 86. napján volt a legnagyobb különbség a kontroll és szelén csoport értékei között, de mind a két esetben nagy szórás párosult az átlagértékekhez, ezért nem volt szignifikáns különbség az eredmények között.

KENDALL és mtsai (2000) merinó kosbárányok esetében végeztek hasonló kísérletet. Eredményeik azt mutatták, hogy a kezelt csoport szeléntartalma a kezelés minden időpontjában magasabb volt, mint a kontroll csoport esetében mért érték, de minden esetben az élettani határértéken belül maradt a vér szeléntartalma mindkét csoport esetében. DIMANOV és mtsai (1989) munkájában olvasható, hogy a corriedale fajta vér szeléntartalma (102-123 ppb) volt a legmagasabb a Bulgáriában vizsgált fajták esetében, míg a helyi őshonos juhajtáknál ez az érték mindössze 40-67 ppb közötti. GHAZVINIAN és mtsai (2005) azt vizsgálták, hogy az évszak és a juhok neme hatással van-e a vér szeléntartalmára. Eredményeik azt mutatták, hogy a vér szeléntartalma télen a legmagasabb, míg tavasszal a legalacsonyabb, továbbá a nőivarú állatok vérében magasabb a szelén koncentrációja.

10. táblázat: A kontroll és szelénes csoport között expressziós különbséget mutató fehérjék

SSP ¹	Azonosított fehérjék	A szekvenciához rendelt			
		azonosító kód	N/C ²	pI/Mw(kDa) ³	Arány ⁴
46	Uncharacterized protein	E1BI82 (Bos taurus)	11/32	8.29/69.149	2.206
54	Matrix metalloproteinase 2	C8BKE4 (Ovis aries)	17/46	5.35/73.851	2.051
55	Matrix metalloproteinase 2	C8BKE4 (Ovis aries)	21/50	5.35/73.851	2.437
60	Serum albumin	P14639 (Ovis aries)	19/36	5.80/69.188	2.292
175	Uncharacterized protein	F1MWD3 (Bos taurus)	11/29	5.62/59.615	0.496
292	Phosphoglycerate kinase	Q32KN6 (Bos taurus)	11/28	8.51/44.758	1.946
294	Isocitrate dehydrogenase [NADP] cytoplasmic	Q6XUZ5 (Ovis aries)	11/41	6.34/46.783	2.474
460	Seminal vesicle protein (Precursore)	A4GZY3 (Ovis aries)	2/13	5.19/17.869	0.639
460	Bodhesin-2 (Fragment)	A1Z181 (Capra hircus)	2/27	6.75/11.656	0.639
549	Bodhesin-2 (Fragment)	A1Z181 (Capra hircus)	2/27	6.75/11.656	1.855

¹Azonosított fehérjepont

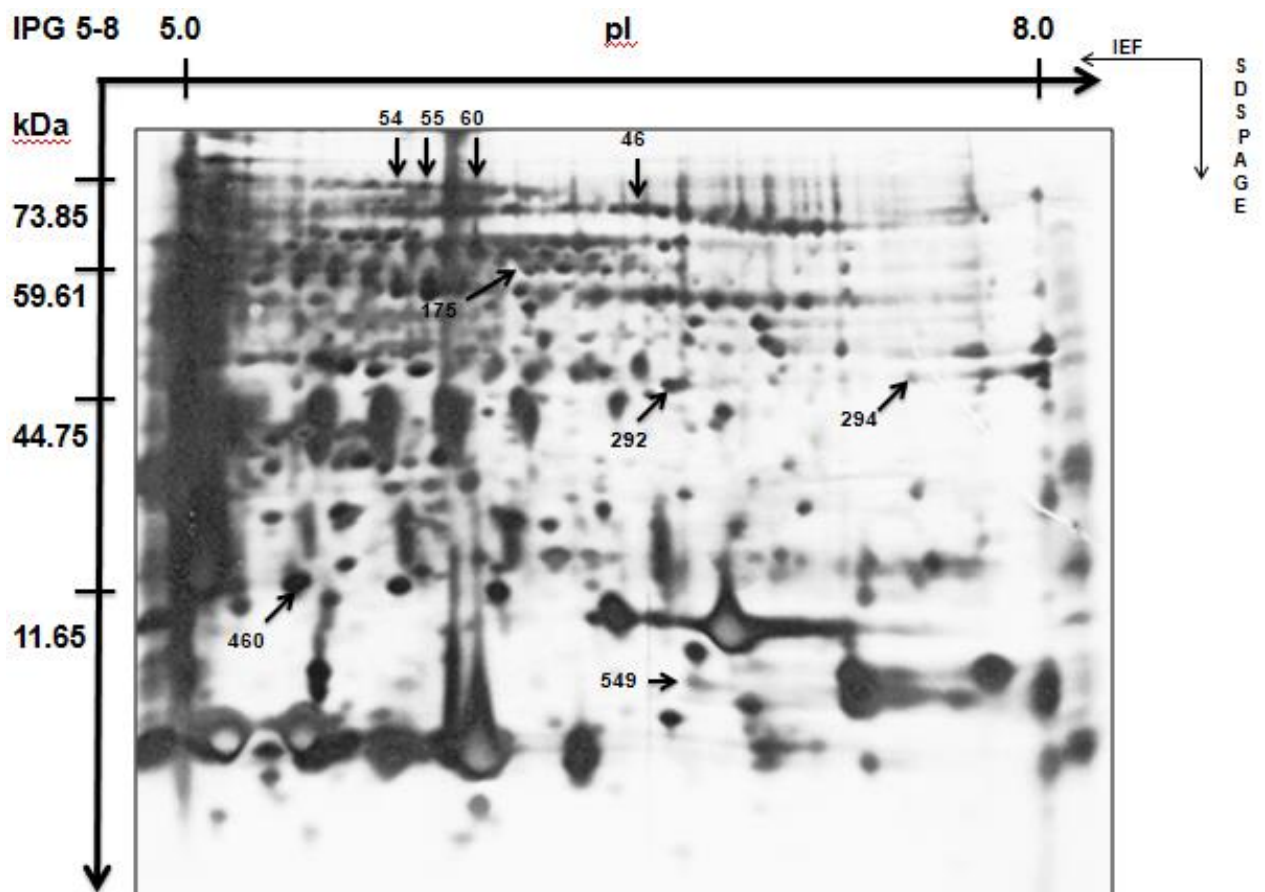
²Azonosított peptidek száma/% szekvencia lefedettség

³Izoelektromos pont és molekulásúly

⁴A kontroll és szelénes csoport aránya

Az LC-MS módszer segítségével tíz fehérjét sikerült azonosítani, melyek expresszója eltérést mutatott a kontroll és kezelt csoport között (10. táblázat, 22. ábra). A matrix metalloproteinase 2 a mártix metalloproteinase (MMP) családba tartozó fehérje. Az enzimnek elsősorban az embrionális fejlődés, morfogenezis, blasztociszta

implantáció folyamatában van szerepe (WOESSNER, 1994). A fehérjét kos, kan és mén mellékhere váladékában már azonosították (MÉTAYER és mtsai, 2002). Jelenleg kevés információ áll rendelkezésre a fehérje pontos funkciójáról, de feltételezhető, hogy a spermaticidák és spermiumok kanyarulat csatornán való áthaladásában vesz részt (WOLFSBERG, 1995). A serum albumin jelentős szerepet játszik a cink transzportációban. HARRISON és mtsai (1978) közleményében olvasható, hogy a serum albuminok jelentős szerepet játszanak a motilitás fenntartásában, de kan sperma esetében fokozzák a spermiumok agglutinációját. A phosphoglycerate kinase 2 (PGK2) fehérje a spermiogenezis során expresszálódik és a glikolízisben vesz részt, mely a spermium mozgásához biztosítja az ATP-t (DANSHINA és mtsai, 2010). Az isocitrate dehydrogenase fehérje és a hím ivari működés közötti kapcsolatról jelenleg nem sok információ áll rendelkezésre. Holstein-fríz bikák esetében a gyenge fertilitású bikák esetében a fehérje expressziója fokozódott (RODRIGUES és mtsai, 2012). Santa Inez kosok esetében a Ram Seminal Vesicle Protein (RSVP) és a Bodhesin-2 fehérjék expressziója volt a legjelentősebb. Az RSVP a binder of sperm protein (BSP) család, míg a bodhesin-2 a spermadhesin fehérjecsalád tagja. A BSP fehérjék a spermamembrán foszfolipidjeivel vannak interakcióban és stimulálják a koleszterin kiáramlását, membránpermeabilizációt és jelenlétük összefüggésbe hozható a kapacitációval is (THÉRIEN és mtsai, 1998). Az RSVP14 és RSVP20 fehérjék dekapacitációs hatását már több fajban is leírták (SOUZA és mtsai, 2012). DRUART és mtsai (2013) juh, szarvasmarha, ló, sertés, teve, alpaka ondóplazma profilját hasonlították össze és arra a megállapításra jutottak, hogy az RSVP14 fehérje minden állatfaj esetében megtalálható a plazmában.



22. ábra: 2D-PAGE gélkép és az azonosított ondóplazma fehérjék

4.3 Az évszak hatása a kosok spermatermelésre és here körméretére

11. táblázat: Dorper kosok spermatermelése és herekörmérete évszakonként

Vizsgált jellemzők	évszak		
	tavaszi (május) (n=8)	nyár (június- augusztus) (n=71)	ősz (szeptember- október) (n=45)
	X±SD	X±SD	X±SD
mennyiség (mL)	1,3±0,4 ^a	1,2±0,4 ^a	1,4±0,5 ^a
sűrűség (x10⁹/mL)	2,7±1,6 ^a	3,3±1,5 ^a	4,1±1,1 ^b
összsejtszám (x10⁹)	3,51±1,0 ^a	3,96±0,95 ^a	5,74±0,8 ^b
tömegmozgás (0-5)	4,0±1,1 ^a	3,5±1,4 ^a	3,7±1,4 ^a
progresszív motilitás (%)	71,3±21,0 ^a	65,3±21,0 ^a	68,7±26,3 ^a
herekörméret (cm)	30,1±1,2 ^a	34,9±2,6 ^b	36,2±1,3 ^c

^{a, b, c} - a különböző betűvel jelölt átlagok szignifikáns (P<0,05) különbségeket mutatnak azonos vizsgált jellemzők esetében

n= adott évszakban a mintavételek számát jelöli

Dorper fajta esetében szignifikáns különbség (P<0,05) volt a tavaszi és őszi sperma sűrűsége között, illetve a kosok herekörmérete mind a három évszakban különbséget (P<0,05) mutatott (11. táblázat). EVANS és MAXWELL (1987) szerint a kos ondó átlagos mennyisége 0,7-2,0 mL között változik, melynek sűrűsége 2-5x10⁹, motilitása 30-90% között mozog. A dorper kosoknál tapasztalt értékek a szerzők által közölt kategóriaérték határain belül mozognak minden évszakban. OLÁH (2010) cigája, ile de france és suffolk fajta esetén azt tapasztalta, hogy az ondó tömegmozgása télen volt a legmagasabb, tavasszal kissé csökkent és nyáron volt a legalacsonyabb. Az eredmények alapján dorper fajta esetében a spermiumok tömegmozgásában, motilitásában és az ondó mennyiségében nem tapasztalható lényeges különbség a különböző évszakokban. A tulajdonság, hogy az ondó mennyiségében és motilitásában nem tapasztalható lényeges változás, kedvező tulajdonság. A mesterséges termékenyítő állomáson termelő kosoknál rendkívül fontos, hogy spermatermelésük és az ondó minősége egész éven át egyenletesen jó legyen. Több szerző is megállapította, hogy a kossperma mennyisége az őszi időszakban a legtöbb, míg tavasszal a legkevesebb

(AMIR és VOLCANI, 1965; EGRSZEGI és mtsai, 2011; OLÁH, 2010). FOURIE és mtsai (2004) azt javasolják, hogy amennyiben a tenyészkosok herekörmérete nem haladja meg a 32 cm-t, úgy azokat nem célszerű tenyésztésbe vonni vagy mesterséges termékenyítő állomáson használni. Az átlagos herekörméretének 32-40 cm között kell lennie évszaktól függetlenül. Mi a dorper fajtánál egyedül a tavaszi időszak alatt mértünk alacsonyabb értékeket. SÁRLÓS és mtsai (2013) fekete racka kosok esetében télen mérték a legkisebb herekörméretet, ami az őszi tenézszezongig fokozatosan növekedett. A januári és szeptemberi értékek között 44,7%-os eltérést tapasztaltak. OLÁH és mtsai (2013) awassi kosok esetében szintén tavasszal mérték a legnagyobb herekörméretet. SÁRLÓS és mtsai (1996) brit tejelő fajtánál szeptemberben mérték a legnagyobb herekörméretet, míg januárban ez az érték 33,5%-al volt kevesebb. MASTERS és FELS (1984) arra hívják fel a figyelmet, hogy az évszakok/fotoperiódus változását bizonyos esetben felülírja a takarmányozás (alul takarmányozás, elhízás) illetve a kihasználás mértéke. Túlzott kihasználtság a spermioenezis zavarát, degradációját okozza, ami a herekörméret csökkenéséhez vezethet. A tavaszi és őszi sűrűség és a herekörméret között tapasztalt különbségek alapján levonható a következtetés, hogy a dorper kosok is érzékenyek a fotoperiódus változására.

12. táblázat: Fehér dorper kosok spermatermelése, here körmérete évszakonként

Paraméterek	évszak			
	tavaszi (május) (n=7)	nyár (június- augusztus) (n=69)	ősz (szeptember- október) (n=74)	tél (december) (n=24)
	X±SD	X±SD	X±SD	X±SD
menyiség (mL)	1,6±1,3 ^a	1,2±0,4 ^a	1,3±0,5 ^a	1,6±0,4 ^b
sűrűség (x10⁹/mL)	3,9±1,3 ^a	3,7±1,8 ^a	3,4±1,7 ^a	3,1±1,2 ^a
összejtszám (x10⁹)	6,24±1,3 ^a	4,44±1,1 ^a	4,42±1,1 ^a	4,96±0,8 ^a
tömegmozgás (0-5 M)	4,0±1,1 ^a	3,7±1,2 ^a	3,6±1,4 ^a	3,5±1,2 ^a
progresszív motilitás (%)	72,1±24,1 ^a	69,5±24,1 ^a	67,1±26,2 ^a	64,3±26,7 ^a
herekörméret (cm)	31,4±2,9 ^a	34,7±2,2 ^b	34,8±2,0 ^b	32,3±2,4 ^a

^{a, b}- a különböző betűvel jelölt átlagok szignifikáns (P<0,05) különbségeket mutatnak azonos vizsgálat jellemzők esetében

n= adott évszakban a mintavételek számát jelöli

Fehér dorper kosok spermamennyisége a szakirodalmakban közölt 0,5-2,0mL-es tartományban van (EVANS és MAXWELL, 1987; GERGÁTZ, 2007). A vizsgált időszakban nyáron (1,2mL) volt a legkevesebb, télen (1,6mL) és tavasszal (1,6mL) a legtöbb az ejakulátum mennyisége. A nyári és téli spermamennyiség között szignifikáns különbség volt ($P < 0,05$) (12. táblázat). OLÁH (2010) ile de france kosoknál ősszel 1,75mL, télen 1,89mL, tavasszal 1,75mL-es átlagos ejakulátumokat állapított meg. EGERSZEGI és mtsai (2011) fekete racka kosoknál tavasszal (március-május) mérték a legkisebb, míg nyáron (június-augusztus) a legnagyobb mennyiséget. A hazai szakirodalmi adatokkal összehasonlítva megállapítható, hogy a fehér dorper kosok spermatermelése, elmarad a már régebbi idők óta tenyésztett fajtákétól. Ez azzal is magyarázható, hogy a vizsgálat megkezdésekor a kosok még csak egy évesek voltak, viszont a spermatermelés kiegyenlítetttsége az életkor előrehaladtával állandósul. A kos ondó sűrűsége átlagosan 3 milliárd/mL (EVANS és MAXWELL, 1987; GERGÁTZ, 2007). A fehér dorper kosok ondójának sűrűsége tavasszal volt a legmagasabb (3,9 milliárd/mL) és télen a legalacsonyabb (3,1 milliárd/mL). A barbadoszi, bábolna tetra és suffolk fajtáknál ősszel volt a legnagyobb a sperma sűrűsége, majd tavaszig folyamatosan csökkent (OLÁH, 2010), míg a fekete racka kosok ejakulátuma tavasszal és nyáron volt a legsűrűbb (EGERSZEGI és mtsai, 2011).

A hazai eredményekkel összehasonlítva megállapítható, hogy fehér dorper kosok ondójának sűrűsége messze meghaladja a szakirodalmi adatokban közölt eredményeket. A spermiumok tömegmozgása (4,0M) és az élő sejtek százalékos aránya (72,1 %) is tavasszal volt a legmagasabb és a téli időszakig folyamatosan csökkent, de az eredmények között nem volt szignifikáns összefüggés ($P > 0,05$). Cigája és ile de france kosok esetében télen volt a legjobb a tömegmozgás és az élő sejtek aránya. Ősszel (74%) és nyáron (64%) a szapora merinó, tavasszal a barbadoszi (69%) fajták rendelkeztek a legmagasabb élő% értékkel. A vizsgált fajtáknál minden esetben nyáron volt a legalacsonyabb a spermiumok mozgása és vitalitása (OLÁH, 2010). SARLÓS és mtsai (1996) brit tejelő kosoknál a téli időszakban tapasztalták a legmagasabb motilitási értékeket, míg a mélypont a nyári időszakban volt.

EGERSZEGI és mtsai (2011) fekete racka kosok esetében 2009-ben tavasszal (4,9 M) és nyáron (5,0M) találták a legjobbnak a motilitást, míg a következő évben tavasszal (4,9M) és télen (4,8M). Összességében elmondható, hogy a fehér dorper kosok spermájának tömegmozgása a szezonális fajtáknál mért értékekkel mutat hasonlóságot.

Az élő sejtek százalékos aránya évszakos ingadozást mutat, de nem mutatható ki szignifikáns különbség az értékek között. A fehér dorper kosok herekörmérete ősszel volt a legnagyobb ($34,8 \pm 2,0$ cm) és tavasszal a legkisebb ($31,4 \pm 2,9$ cm). A mért értékek között szignifikáns ($P < 0,05$) különbséget állapítottunk meg. Az eredményeink hasonlóak az awassi kosoknál (35,5cm) mért adatokhoz, melyeknél szinten az őszi időszakban volt a legnagyobb a herekörméret. A barbadoszi, bábolna tetra, cigája és ile de france fajtáknál nyáron, suffolknál tavasszal, szapora merinónál télen mérték a legnagyobb herekörméretet (OLÁH, 2010).

Dorper és fehér dorper kosok esetében megállapítható, hogy a herekörméret változása kisebb mértékű, mint a hazánkban eddig vizsgált fajtáknál.

4.4 A kurkumin és ondóplazma protein kiegészítés hatása a kos spermára

4. kísérlet: A kurkumin és az ondóplazma protein kiegészítés hatása a +5°C-on tárolt kos spermára

13. táblázat: Membránintegritás és mitokondriális aktivitás vizsgálata a +5°C-ra hűtött spermánál

Vizsgált jellemzők	Hígító	Eltartás ideje		
		0h	24h	48h
(%)		X±SD	X±SD	X±SD
PI-	tejes (kontroll)	60,29±15,14	59,10±7,77	55,16±5,42
	+1,0nM kurkumin	58,11±15,40	58,93±7,72	32,21±27,98
	+2,0nM kurkumin	59,79±9,20	59,61±3,37	37,68±34,3
	+25mg/ml ondóplazma protein	45,65±34,43	46,72±30,23	37,57±30,29
YoPro- /Mitotracker+	tejes (kontroll)	99,2±0,00	98,25±1,9	66,40±35,9
	+1,0nM kurkumin	99,35±0,63	97,65±0,63	68,55±29,06
	+2,0nM kurkumin	99,55±0,49	98,65±1,48	64,50±37,47
	+25mg/ml ondóplazma protein	99,30±0,42	98,75±1,03	73,07±27,03

(P>0,05)

Az eredmények alapján a kontroll hígítóban volt a legtöbb ép, feji plazmamembránnal rendelkező spermium. Érdekes megfigyelni, hogy a 48h-ás eltartás után ezek a sejtek veszítették el legnagyobb arányban a mitokondriális aktivitásukat és a motilitás is ennél a csoportnál volt a legalacsonyabb (13. táblázat). Az eredményekre a MANJUNATH (2012) által közölték adhatnak magyarázatot. A tejben lévő kazeinek képesek a spermasejt membránját alkotó proteinekhez kötődni, ezáltal védelmet biztosítanak a szabadgyökök károsító hatása ellen. Mivel a spermium feji részén a legnagyobb a membránfelület, ezért valószínűsíthető, hogy a spermiumok fején biztosított a leghatékonyabb membránvédelem, míg a középrész és fark csak kevés fehérje megkötésére alkalmas. SOLEIMANZADEH és SABERIVAND (2013) eltérő eredményeket közölték 2,5nM kurkumin kiegészítés esetén. Patkány sperma +5°C-os tárolása során a kurkumin kiegészítés hatására kedvezőbb volt a spermiumok motilitása, membránintegritása és a DNS fragmentációval rendelkező sejtek aránya a kontrollhoz viszonyítva.

A mitokondriumok a membránfolyamatok fenntartásához termelik az ATP-t, sérülésük hatással van az apoptikus folyamatok beindulására. A mitokondrium károsodás során szabadgyökök szabadulnak fel, melyek a membránszerkezet megbomlását és a DNS fragmentációját okozzák, ami negatívan befolyásolja a spermium fertilizációs képességét. A mitokondriális aktivitás a 24h-ás tárolás során nem csökkent érdemben, viszont a 48h-s tárolást követően jelentősen megnövekedett a károsodott mitokondriumok aránya, de az eredmények nem mutattak szignifikáns különbséget ($P>0,05$). A mitokondriális károsodás mértéke összefüggésben lehet azzal, hogy a tárolási folyamat során nő a szabadgyökök mennyisége.

14. táblázat: Kapacitációs státusz vizsgálata CTC-módszerrel

Vizsgált jellemzők	Hígító	Eltartás ideje		
		0h	24h	48h
(%)		X±SD	X±SD	X±SD
NCL	tejes (kontroll)	34,50±19,09	19,00±9,89	9,50±4,94
	+1,0nM kurkumin	39,50±13,43	24,50±6,36	17,00±0,00
	+2,0nM kurkumin	39,50±13,43	21,50±0,70	15,50±3,53
	+25mg/ml ondóplazma protein	33,50±23,33	20,50±13,43	16,50±13,43
NCD	tejes (kontroll)	5,00±2,82	9,00±2,72	14,50±9,19
	+1,0nM kurkumin	5,50±4,94	5,00±1,41	15,00±4,24
	+2,0nM kurkumin	8,5±3,53	8,00±1,31	14,50±10,60
	+25mg/ml ondóplazma protein	8,50±7,77	15,50±7,67	18,00±8,38
C	tejes (kontroll)	48,00±16,97	52,50±20,50	54,50±21,92
	+1,0nM kurkumin	43,50±6,36	44,00±2,82	41,00±8,48
	+2,0nM kurkumin	37,50±6,36	41,50±16,26	37,50±17,67
	+25mg/ml ondóplazma protein	38,00±1,41	39,00±7,07	36,50±7,77
R	tejes (kontroll)	12,50±0,70	19,50±2,12	21,50±7,77
	+1,0nM kurkumin	12,00±1,41	21,50±3,53	27,00±4,24
	+2,0nM kurkumin	14,50±3,53	29,00±4,24	32,50±3,53
	+25mg/ml ondóplazma protein	20,00±14,14	25,00±14,04	29,00±24,04

($P>0,05$)

Arra a következtetésre jutottam, hogy a 1,0 nM kurkumin tartalmú hígítókban volt a legtöbb a nem kapacitált, élő sejtek száma, míg a legnagyobb arányban a kontroll hígítóban csökkent ezek aránya. A kapacitált sejtek száma kontrollban volt a legmagasabb, míg a protein kiegészítés sikeresen megvédte a spermiumok membránját, de a hígítók között tapasztalt különbség nem volt szignifikáns ($P>0,05$) (14. táblázat). PAULENZ és mtsai (2002) munkájukban eltérő eredményeket közöltek. A tej alapú hígítónál 0 és 24h-ás tárolást követően a sejtek 70% tartozott a nem kapacitált csoportba.

15. táblázat: A foszfatidilszerin transzlokáció vizsgálat eredményei

Vizsgált jellemzők (%)	Hígító	Eltartás ideje		
		0h X±SD	24h X±SD	48h X±SD
Anx+/PI- foszfatidilszerin transzlokált, élő sejtek	tejes (kontrol)	3,70±3,67	3,55±2,47	4,95±1,76
	+1,0nM kurkumin	7,55±8,69	4,00±2,69	2,90±1,41
	+2,0nM kurkumin	8,20±6,47	10,75±2,19	15,10±0,70
	+25mg/ml ondóplazma protein	6,60±4,63	13,00±2,26	19,55±10,53
Anx-/PI+ foszfatidilszerin transzlokációtól mentes, elhalt sejtek	tejes (kontrol)	20,35±13,68	21,90±7,63	22,60±0,42
	+1,0nM kurkumin	18,80±9,19	19,95±2,61	22,55±2,33
	+2,0nM kurkumin	23,35±13,93	24,35±1,62	33,00±7,91
	+25mg/ml ondóplazma protein	17,85±4,73	27,05±1,76	32,75±22,31
Anx-/PI- foszfatidilszerin transzlokációtól mentes, élő sejtek	tejes (kontrol)	34,65±29,9	20,90±2,96	18,85±14,83
	+1,0nM kurkumin	27,80±0,70	19,85±2,19	15,20±1,69
	+2,0nM kurkumin	14,75±1,62	10,25±3,04	15,95±4,14
	+25mg/ml ondóplazma protein	25,65±3,74	15,25±7,50	13,65±6,32
Anx+/PI+ foszfatidilszerin transzlokált, elhalt sejtek	tejes (kontrol)	41,30±12,32	53,65±6,92	53,60±12,65
	+1,0nM kurkumin	45,85±8,83	56,20±5,30	59,35±11,17
	+2,0nM kurkumin	53,70±8,55	54,68±0,49	49,95±7,21
	+25mg/ml ondóplazma protein	49,90±6,57	44,70±5,65	47,50±0,84

($P>0,05$)

A sperma hűtése és a foszfatidil szerin transzlokáció közötti kapcsolat ismert. Hidegsokk hatására fokozódik a membrán fluiditása és fokozódik a plazmamembránt alkotó foszfatidilszerin transzlokációja (MARTÍ és mtsai, 2008). Az eltartási próba során folyamatosan növekedett a foszfatidilszerin transzlokációval rendelkező sejtek száma. A legnagyobb arányú növekedést a +25mg/mL ondóplazma proteint tartalmazó mintánál tapasztaltam ($P>0,05$) (15. táblázat). Mivel a kísérlet elvégzése előtt nem használtunk swim-up módszert az ondóplazma eltávolítására, ezért a szemínális plazma fehérjék is okozhatták az apoptikus folyamat felgyorsulását. MANJUNATH (2012) közleményében arról számol be, hogy a szemínális plazma tartalmaz olyan komponenseket, amelyek csökkentik a spermiumok fertilizációs képességét, de jelenleg még nem ismert a folyamat pontos lejátszódása. Az egyik hipotézis szerint a BSP (Binder of Sperm Proteins) fehérjék képesek a plazmamembrán foszfolipidjeihez és a koleszterinhez kötődni, ezáltal megbontva a membrán szerkezetet. A tejben lévő kazeinek, α -laktoalbumin és β -laktoglobulin képes megkötni a BSP fehérjéket, ezáltal védik a spermamembrán szerkezetét (BERGERON és mtsai, 2007). Az általunk elért eredmények magyarázata lehet, hogy a tejben nem volt elég fehérje, amely képes volt semlegesíteni az ondóplazmában lévő BSP fehérjék hatását.

16. táblázat: A Casp-3,-7 aktivitás eredménye +5°C-ra hűtött sperma esetén

Vizsgált jellemzők	Hígító	Eltartás ideje		
		0h	24h	48h
(%)		X \pm SD	X \pm SD	X \pm SD
Casp-/Eth-	tejes (kontroll)	38,18 \pm 21,89	36,75 \pm 2,33	34,20 \pm 5,93
	+1,0nM kurkumin	54,25 \pm 10,96	38,10 \pm 3,11	36,60 \pm 3,67
	+2,0nm kurkumin	48,30 \pm 0,56	43,40 \pm 9,61	41,10 \pm 2,68
	+25mg/ml ondóplazma proteín	53,80 \pm 4,24	46,60 \pm 32,24	40,80 \pm 18,72
Casp-/Eth+	tejes (kontroll)	4,45 \pm 4,17	9,55 \pm 6,29	9,90 \pm 4,10
	+1,0nM kurkumin	9,50 \pm 2,82	9,45 \pm 6,15	10,10 \pm 5,79
	+2,0nM kurkumin	7,80 \pm 6,36	12,85 \pm 7,00	13,05 \pm 5,72
	+25mg/ml ondóplazma proteín	7,00 \pm 6,08	4,95 \pm 0,91	8,15 \pm 2,61

Casp+/Eth-	tejes (kontroll)	22,75±12,23	32,40±6,92	27,05±12,65
	+1,0nM kurkumin	18,55±8,83	32,65±5,30	28,10±11,17
	+2,0nM kurkumin	29,15±8,55	23,45±0,49	19,90±7,21
	+25mg/ml ondóplazma protein	23,65±6,57	13,20±5,65	7,40±0,84
Casp+/Eth+	tejes (kontroll)	34,65±29,91	20,90±2,96	28,85±2,61
	+1,0nM kurkumin	17,80±0,70	19,85±2,19	25,20±1,69
	+2,0nM kurkumin	14,75±1,62	20,25±3,04	25,95±4,17
	+25mg/ml ondóplazma protein	15,65±3,74	35,25±27,50	43,65±26,37

(P>0,05)

Az apoptózis vizsgálata során a leginformatívabb kategória a nem apoptikus sejteket tartalmazó Casp-/Eth- kategória. A 24 és 48h-ás tárolás során a kontroll hígítóban csökkent a legkisebb mértékben a Casp-/Eth- spermiumok száma, míg a szeménális plazma proteinnel végzett hűtés ebben az esetben nem bizonyult hatásosnak (16. táblázat). A tejben lévő kazeinek képesek micellákat alkotni és a spermamembránhoz kötődni, ezáltal védik az ondósejteket a hidegsokkal szemben, a membránszerkezet stabilizálása révén (BERGERON és mtsai, 2007). Kos (CHOONG és WALES, 1962), mén (BATELLIER és mtsai, 1997) és bika (O'SHEA és WALES, 1966) esetében a kazeinek membránvédő hatását már igazolták a termékenyítőanyag +4°C-ra hűtése során.

17. táblázat: A TUNEL- teszt eredménye a 48h-ás eltartási próba során

Vizsgált jellemzők	Hígító	Eltartás ideje		
		0h	24h	48h
(%)		X±SD	X±SD	X±SD
Tunel-	tejes (kontroll)	88,50±2,12	24,15±0,63	32,95±12,09
	+1,0nM kurkumin	59,70±36,91	67,05±12,09	63,55±27,7
	+2,0nM kurkumin	65,60±35,63	58,20±6,78	65,50±10,66
	+25mg/ml ondóplazma protein	49,00±39,59	39,40±14,70	41,35±33,46
Tunel+	tejes (kontroll)	11,50±1,76	75,85±33,37	67,05±49,35
	+1,0nM	40,30±33,37	32,95±12,09	34,45±27,78

	kurkumin			
	+2,0nM kurkumin	34,40±15,63	41,80±3,95	34,50±10,60
	+25mg/ml ondóplazma protein	51,00±35,35	60,60±14,70	58,65±33,44

(P>0,05)

Hűtést követően a kontroll hígítóban volt a legmagasabb a DNS intakt sejtek száma, míg ondóplazma kiegészítés hatására mindössze a sejtek 49%-a rendelkezett ép örökítő anyaggal. A 24h-ás eltartást követően a kontroll hígítóban sérültek a legnagyobb arányban a sejtek és az 1,0nM kurkumint tartalmazó hígítóban volt a legmagasabb ezek aránya. A 2,0nM kurkumin tartalmú hígítóban a 48h-át követően is 65% volt a DNS fragmentációtól mentes spermiumok száma, ami megegyezik a 0h-nál elért eredménnyel, de az 1,0nM kurkumin tartalmú hígítóban sem változott számottevően a DNS intakt spermiumok aránya. Az eredmények alapján levonható a következtetés, hogy az 1,0nM és 2,0nM tartalmú hígító eredményesen alkalmazható a sperma +5°C-on való tárolására (17. táblázat). A munkánk során kapott eredményeket –még ha statisztikailag nem is igazolhatóan- megerősíti MENDOZA és mtsai (2013) megállapítása, miszerint hűtés növeli a Tunel+ sejtek számát, de szeminális plazma kiegészítéssel csökkenthető a hűtés DNS-t károsító hatása. A DNS fragmentáció mértékét a hűtés hatására kialakuló, hidegsokk, oxidatív stressz és a sejtmembrán lipid-peroxidációja fokozza (CHEN és mtsai, 1997), de mivel egyes plazma fehérjék képesek a spermasejt membránjához kötődni, és képesek a stressz hatására megváltozott membrán szerkezetét helyreállítani (BARRIOS és mtsai, 2000).

18. táblázat: Az in vitro fertilizáció eredményei a sperma 24h-ás tárolását követően

Csoport	Maturál t	24h után	48 h után	Blasztociszt a	Sejt/blasztociszt a
Kontroll	22/38 (57,9%)	14/22 (63,6%)	14/38 (36,8%)	4/14 (28,6%)	135,66 ± 39,43
+1,0 nM kurkumin	20/37 (54,1%)	16/20 (80,0%) ^a	16/37 (43,2%) ^a	4/16 (25,0%)	146,0 ± 33,86
+2,0 nM kurkumin	16/35 (45,7%)	12/16 (75,0%) ^c	10/35 (28,6%)	1/10 (10%)	83,0
+25mg/ml protein	16/38 (42,1%)	7/16 (43,8%) ^b , _a	7/38 (18,4%) ^b	2/7 (28,6%)	160,00 ± 48,00

a, b: p<0,05; c,d: p<0,1

A spermiumok termékenyítőképességét 24h-ás eltartást követően in vitro fertilizációval határoztuk meg. A barázdálódás kezdeti stádiumában a kontroll

csoporthoz tapasztaltuk a legjobb eredményeket. A legtöbb sejt/blasztociszta sejt a kontroll és a protein csoportban volt, közel azonos arányban. A protein csoport blasztocisztái rendelkeztek a legtöbb sejttel, míg a 2,0nM kurkumin tartamú csoport blasztocisztái a legkevesebbel. Az eredmények alapján a 2,0nM kurkumin koncentráció már magas az eredményes fertilizációhoz. A protein kiegészítés hatékonynak bizonyult, mivel a legmagasabb sejt/blasztociszta arányt itt értük el, de a kontroll csoporthoz képest nem volt kimutatható szignifikáns különbség ($P > 0,05$) az eredményekben (18. táblázat). Kurkumával kiegészített hígítóval a korábbiakban még nem végeztek in vitro fertilizációt, de a szeminális plazma proteinek pozitív hatását sertésben (HERNANDEZ és mtsai, 2007) már igazolták. FOOTE és mtsai (2002) szerint a tej magas kazein tartalma miatt antioxidánsként viselkedik. A tej alapú hígítóhoz adott különböző antioxidánsok (SOD, aszkorbinsav, hipotaurin) nem javították a bikaspermiumok motilitását és a fertilizációs képességüket sem befolyásolták.

4.5 A kurkumin és ondóplazma plazma kiegészítés hatása a +15°C-on tárolt kos spermára

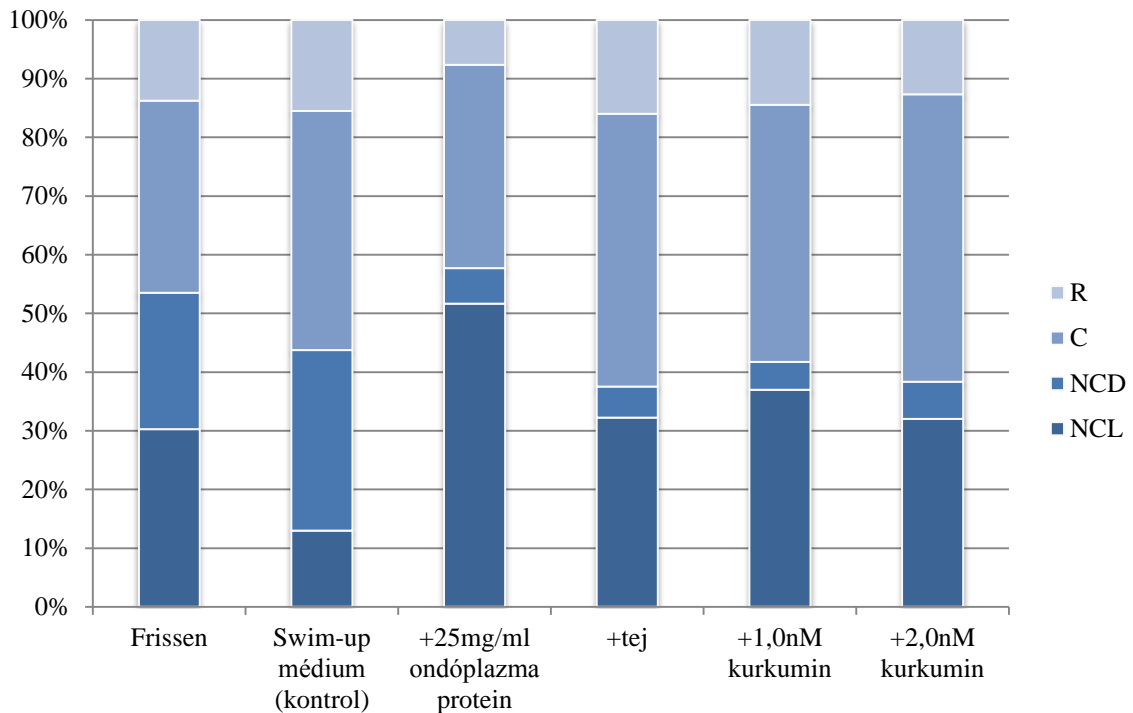
19. táblázat: A kurkumin és ondóplazma kiegészítés hatása a +15°C-on tárolt kossperma motilitására, membránintegritására és a mitokondriális aktivitásra

Swim-up után						
Vizsgált jellemzők	Frissen	Hűtés után				
		Swim-up médium (kontroll)	+25mg/ml ondóplazma protein	+tej	+1,0nM kurkumin	+2,0nM kurkumin
(%)	X±SD	X±SD	X±SD	X±SD	X±SD	X±SD
Motilitás	77,50±12,34	57,80±15,80	89,00±5,29	75,50±16,42	76,75±15,56	66,33±15,30
Progresszív motilitás	34,00±7,74	20,00±19,35	43,00±15,62	37,25±9,56	38,50±6,24	42,33±11,93
PI	44,90±18,11 ^a	30,00±8,97 ^b	77,16±5,30 ^a	45,52±11,56 ^a	41,80±15,72 ^a	40,13±7,91 ^a
YoPro-/Mitracker+	96,17±3,80	97,35±1,53	97,46±3,35	96,85±1,99	96,37±2,43	97,40±1,93

^{a, b, c} - a különböző betűvel jelölt átlagok szignifikáns ($P < 0,05$) különbségeket mutatnak azonos vizsgálat jellemzők esetében

Friss sperma esetében a progresszív motilitás 34% volt, ami hűtést követően a 20%-ra csökkent. Ondóplazma kiegészítés hatására hűtést követően növekedett a motilis sejtek aránya, ahogyan a kurkumin kiegészítés is pozitív hatással volt a motilitásra, de az eredmények között nem volt szignifikáns különbség ($P > 0,05$). A membránintakt sejtek aránya hűtést követően az ondóplazma proteinnel kezelt mintában volt a legtöbb (77,16%), míg a többi kezelésnek nem volt hatása a spermiumok membránintegritására ($P > 0,05$). A spermiumok membránjához kötődő ondóplazma proteinek képesek megvédeni a sejteket a káros hatásoktól (pl.: hidegsokk) (BARRIOS, 2000). A mitokondriális aktivitás egyik esetben sem mutatott eltérést a kontrollhoz viszonyítva (19. táblázat). DOMINGEZ és mtsai (2008) hasonló megállapításra jutottak fagyasztott kos spermával végzett kísérletükben, ahol a tenyészszézonban gyűjtött ondóplazmával végzett hígítás pozitív hatással gyakorolt a felolvasztott mintáknál a spermasejtek motilitására. ALVAREZ és STOREY (1995) szerint elsősorban a szeminális plazmában lévő albuminnak van szerepe a spermamembrán védelmébe és a motilitás fenntartásában. BUCAK és mtsai (2012) fagyasztott bikasperma esetében vizsgálták a 0,5mM és 2,0mM kurkumin kiegészítés hatását. Eredményeik alapján

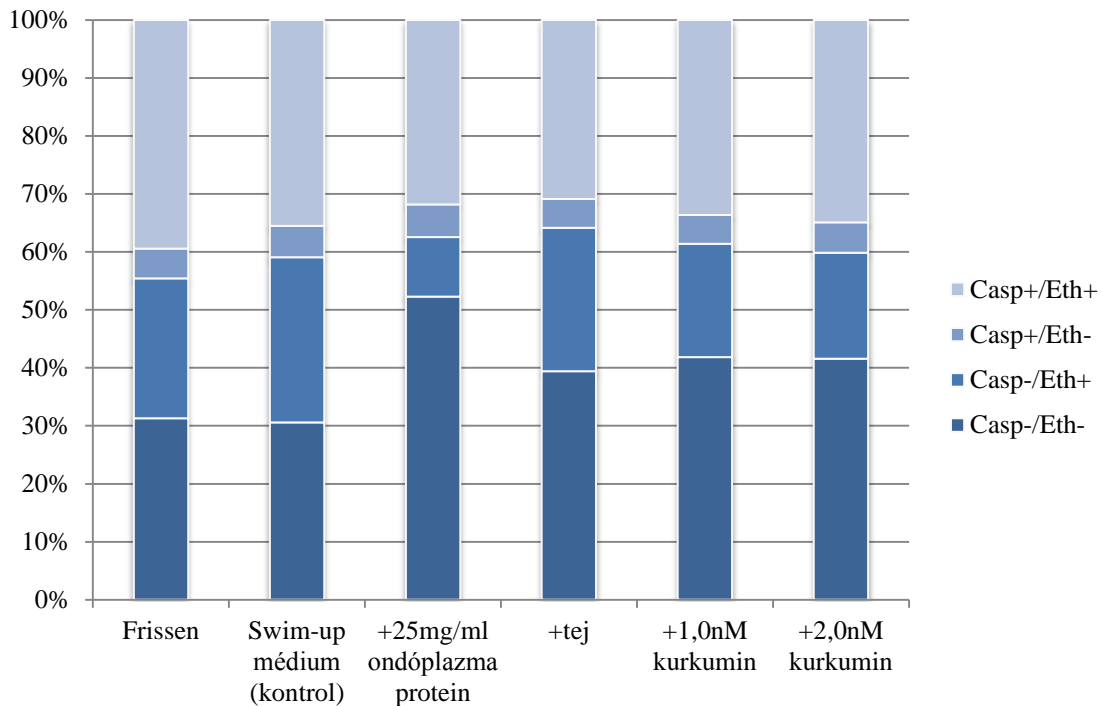
0,5nM kurkumin tartalmú hígítóban alacsonyabb volt az abnormalis sejtek aránya és a sejtek membránintegritása ($P < 0,001$).



23. ábra: A kapacitációs státusz vizsgálati eredménye

A továbbiakban a vizsgált tulajdonságok átlag- és szórás értékei az 1. mellékletben találhatóak meg. A kapacitációs státusz vizsgálata során a friss spermiumok mindössze 30,25%-volt élő és nem kapacitált, ami igen alacsony. MENDOZA és mtsai (2013) friss spermánál 61,3%-os értékről számoltak be, ami +15°C-ra hűtést követően csökkent 26,6%-a, míg ondóplazma kiegészítéssel 33,2%-ra csökkent, ami esetünkben 51,66% volt. A tej, illetve kurkumin tartalmú hígítóban az élő, nem kapacitált sejtek száma a friss spermában kapott értékhez hasonló, attól nem különbözik szignifikáns mértékben ($P > 0,05$) (23. ábra). Az utóbbi hígítóban viszont magasabb a kapacitáción átesett sejtek száma, a kontroll hígítóhoz viszonyítva. VADNAIS és mtsai (2005) kan sperma esetében vizsgálták, hogyan befolyásolja a 20% (v/v) szeminális plazma kiegészítés a spermiumok kapacitációs státuszát +5°C-ra hűtés esetében. A kísérlet során azt az eredményt kapták, hogy az ondóplazma kiegészítés képes csökkenteni és visszafordítani a kapacitáció folyamatát. Friss sperma esetében a sejtek 63,3%-a volt kapacitált, hűtést követően 34,2% volt a kapacitált spermasejtek aránya a szeminális plazmával végzett kezelés hatására. MAXWELL és mtsai (1999) szintén arról számoltak be, hogy fagyasztott, majd felolvasztott kossperma mintáknál

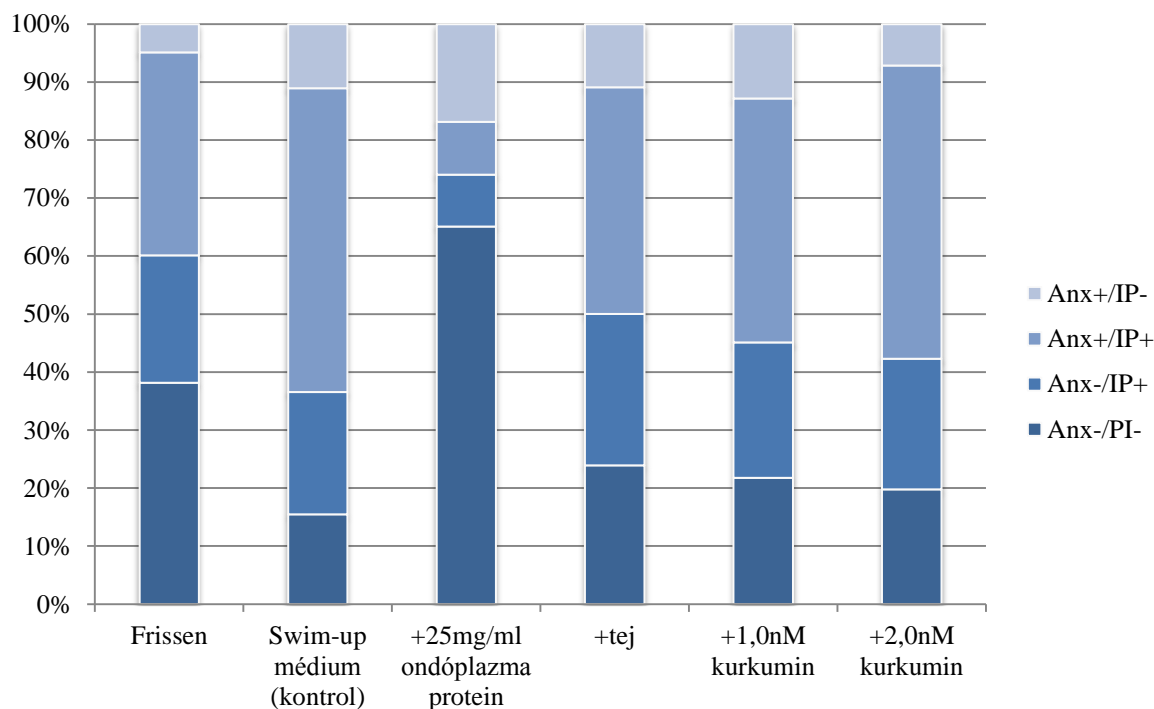
több volt a nem kapacitált és akroszóma reakción átesett sejtek száma, amennyiben szeminális plazmát adtak a hígítóhoz.



24. ábra: Az apoptózis vizsgálat eredménye +15°C-ra hűtött kosspermánál

Friss sperma esetében a Casp+/Eth- sejtek aránya 5,15% volt, ami hűtést követően nem növekedett számottevő mértékben (5,45%). A protein (5,66%), 1,0nM kurkumin (5,00%), 2,0nM kurkumin (5,26%) kiegészítés szintén nem növelte szignifikáns mértékben ($P>0,05$) a kaszpáz aktivitást mutató sejtek számát. Hűtést követően az eredmények azt mutatták, hogy ondóplazma kiegészítés hatására megnövekedett a nem apoptikus sejtek száma (52,33%), mind a friss spermához (31,27%), mind a hűtött, kontroll mintához (30,55%) viszonyítva. A kurkumin is képes volt csökkenteni az apoptikus folyamat felgyorsulását függetlenül az alkalmazott koncentrációtól (24. ábra). MENDOZA és mtsai (2013) szintén azt tapasztalták, hogy a szeminális plazma kiegészítés csökkenti a caspase-3, -7 aktivitását, ezáltal lassítja a kaszpáz kaszkád működését és az apoptózis folyamatát. A korábbiakban még nem végeztek olyan kutatást, mely a spermasejtek kaszpáz-3, -7 aktivitását és a kurkumin kölcsönhatását vizsgálta. ANTO és mtsai (2002) azt tanulmányozták, hogy a kurkumin hogyan befolyásolja tumor sejteknél az apoptózis folyamatát. Eredményeik alapján a kurkumin az iniciátor kaszpáz-8 és kaszpáz-3 aktivitását növelte meg. A két kaszpáz aktivációja szoros összefüggést mutat, mivel a kaszpáz-8 a halálreceptorok által toborzott halálfehérjekomplexről, a jelkomplexről induló jel által képes aktiválni a kaszpáz-3-at.

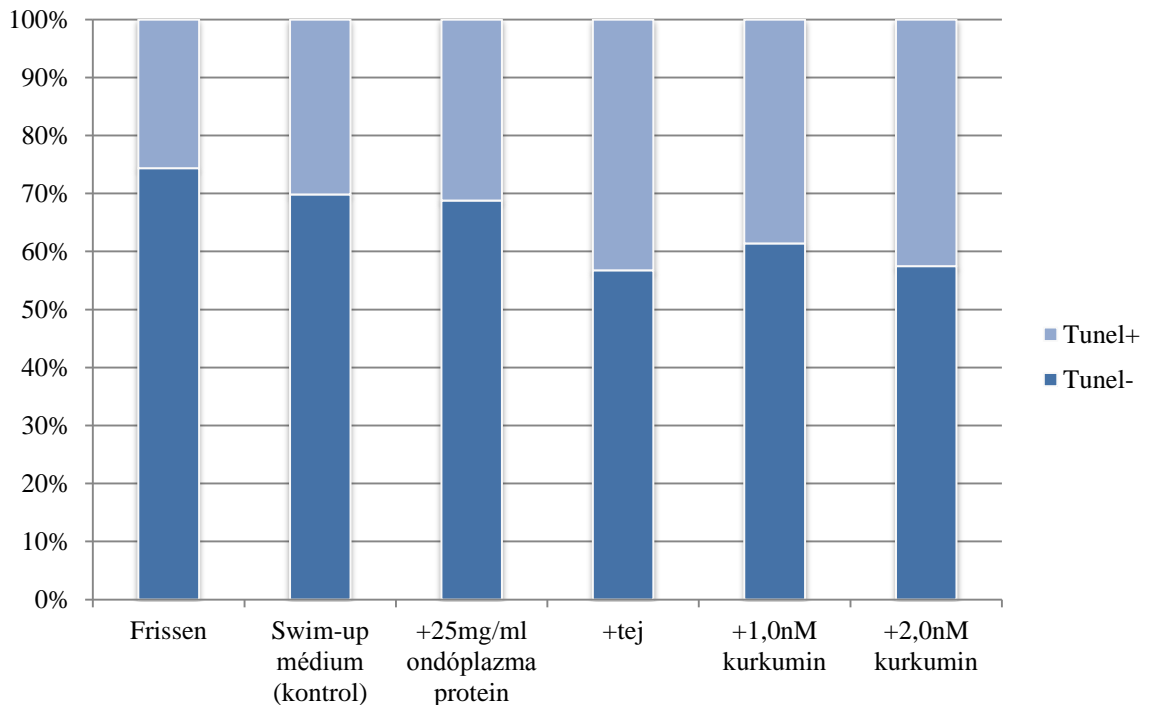
ZHAO és mtsai (1989) tanulmányában szintén az olvasható, hogy a kurkumin az intrinsic (mitokondriális) kaszpáz kaszkád aktivizációját váltja ki a kaszpáz-8, -3 aktiválásával.



25. ábra: A foszfatidilszerin transzlokáció mértéke a +15°C-ra hűtött termékenyítőanyagban

A foszfatidilszerin transzlokáció mértékét az 25. ábra szemlélteti. Friss spermánál az Anx+ sejtek száma 39,87% volt, ami átlagos értéknek számít. MENDOZA és mtsai (2012) hasonló, 34,0%-os értékről számoltak be friss sperma esetében. Hűtést követően a kontroll hígítóban közel kétszeresére emelkedett az Anx+ sejtek száma (63,41%), ellentétben a proteines hígítóval, amelyben csökkent a PS transzlokáció mértéke és a sejtek 25,97% volt Anx+. Az Anx-/PI- sejtek száma a friss, kontroll és a proteinnel kezelt minták esetében szignifikáns ($P < 0,05$) különbséget mutatott. MENDOZA és mtsai (2013) szintén hasonló eredményeket kaptak hűtést követően. Friss sperma esetében az Anx+ sejtek aránya 22,0% volt, ami hűtést követően 14,5%-ra csökkent abban az esetben, amikor a mintához 1,7mg/ml szeménális plazma kiegészítést adtak. A kurkumin kiegészítés a PS transzlokáció mértékét növelte hűtést követően, mivel az 1,0nM mintánál a sejtek 54,88%-a, míg 2,0nM esetén 57,7%-a volt Anx+, amiből levonható a következtetés, hogy a kurkumin fokozza a foszfatidilszerin transzlokáció mértékét. JARUGA és mtsai (1998) vörösvérsejtekénél tapasztalták, hogy a kurkumin koncentráció növelése pozitív korrelációban van a foszfatidilszerin transzlokáció

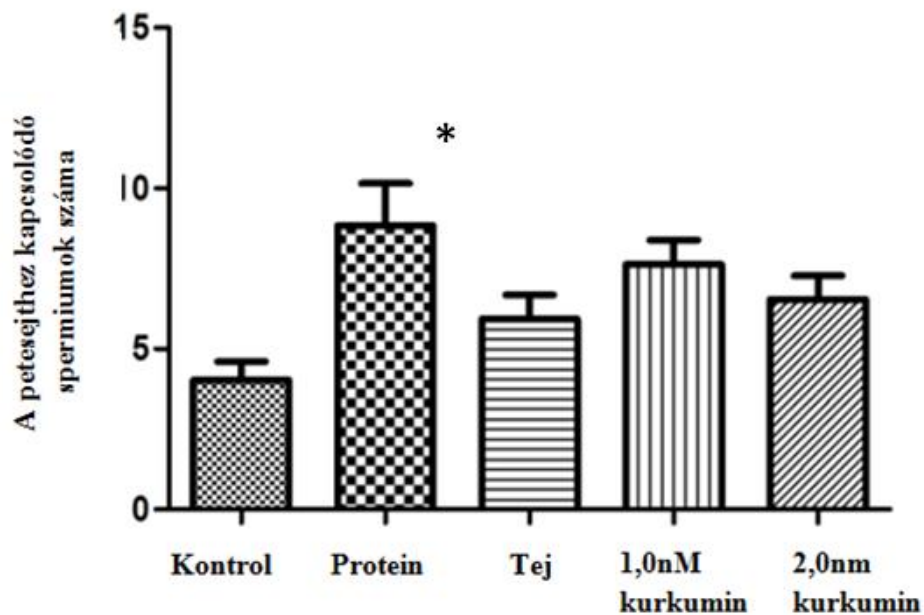
mértékével. Kurkumin kiegészítés hatására a vörösvérsejtek echinocytosison mentek keresztül, ami azt jelenti, hogy a sejtek membránja megnyúlik és tüskéhez hasonló képletek jelennek meg a vörösvértest felszínén. VINOD és mtsai (2013) a mellrákot okozó daganatos sejteket inkubáltak 10µm kurkumint tartalmazó tápfolyadékban és a kurkumin kiegészítés fokozta a rákos sejteknél a PS transzlokáció mértékét.



26. ábra: A Tunel teszt eredménye +15°C-ra hűtött kosspermánál

A hűtött mintában a DNS károsodás mértékét a 26. ábra szemlélteti. A DNS fragmentáció mértéke a friss sperma esetében magas, 25,60%. A +15°C-ra hűtést követően a swim-up médiumban tárolt spermánál volt a legmagasabb a Tunel- sejtek száma (69,87%). A protein kiegészítéssel hasonló eredmény tapasztaltunk (68,80%). A kurkumin kezelés hatására csökkent a DNS intakt sejtek száma, 1,0nM esetében (61,42%), 2,0nM (57,50%). A tej tartalmú hígítóban volt a legkevesebb DNS intakt sejt (56,77%), azonban a különböző hígítók hatása között nem volt szignifikáns különbség ($P > 0,05$). MENDOZA és mtsai (2013) eltérő eredményeket közöltek +15°C-ra hűtött kossperma esetében. Friss sperma esetén mindössze 1,6% volt a DNS károsodott sejtek száma. Hűtést követően a kontroll mintában 8,4%-ra emelkedett a károsodott sejtek száma, míg a szemínális plazma kiegészítés hatására 7,5% volt a DNS fragmentációval rendelkező ondósejtek aránya, ami szignifikáns mértékben ($P < 0,001$) különbözött a kontroll csoportban kapott eredménytől. Friss sperma esetében MENDOZA és mtsai (2012) a sejtek mindössze 4,89%-nál tapasztaltak DNS fragmentációt, míg 20°C-ra

hűtött kos sperma esetében ez az érték 10,54%, ami szintén kedvezőbb, mint az általunk kapott eredmények friss sperma esetében. Erre a jelenségre magyarázat lehet, hogy a rasa aragonesa juh szezonális fajta és mivel április-májusban végeztük a kísérletet (szezonon kívül), ez magyarázat lehet arra, hogy miért volt magas már friss sperma esetében is a Tunel+ sejtek száma.

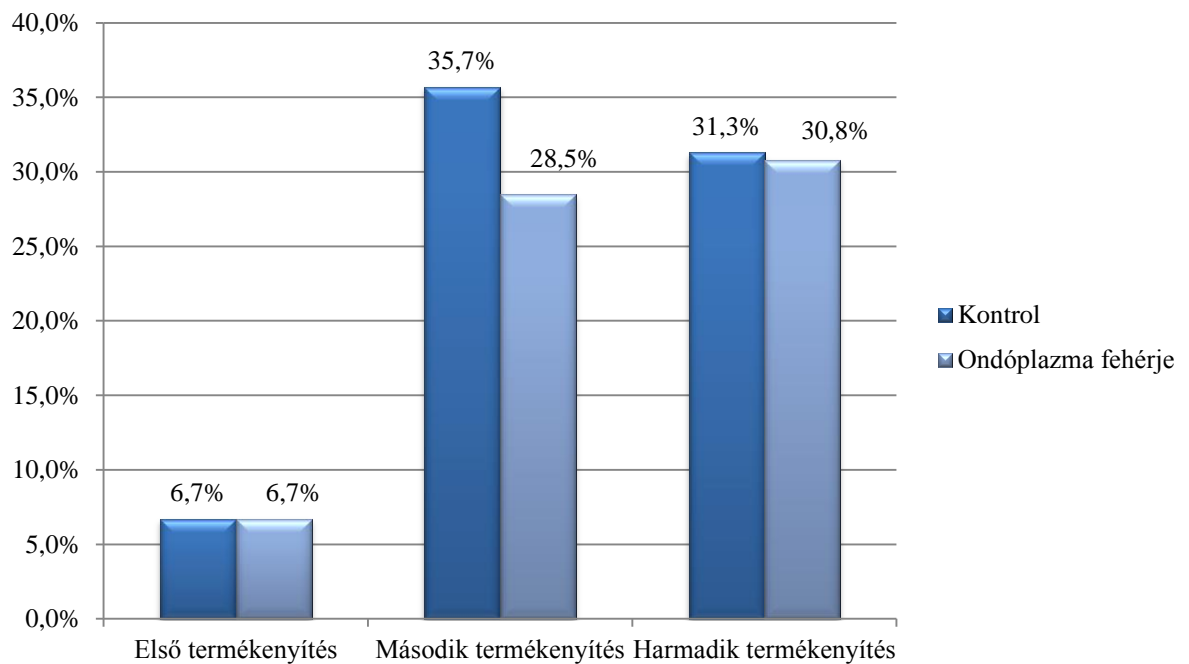


A * a szignifikáns különbséget jelzi ($P < 0,001$)

27. ábra: A petesejthez kötődő spermiumok száma a különböző típusú +15°C-ra hűtött, hígított sperma esetén

A mesterséges termékenyítéssel egy időben peteburok kötődési teszt segítségével is meghatároztuk a különböző médiumokban tárolt kossperma fertilizációs képességét. Az eredmények alapján az ondóplazma protein kiegészítésnek pozitív hatása volt spermiumok fertilizációs képességére, átlagosan 8,2 spermium kötődött egy petesejthez. A 1,0nM kurkumint tartalmazó hígítóban 6,4 spermium/petesejt, míg a 2,0nM kurkumin tartalmúnál 6,2 spermium/petesejt kötődött. A kontroll hígítóban volt a legalacsonyabb, 4,8 spermium/petesejt az ondósejtek fertilizációs képessége. Az ondóplazma protein tartalmú hígítóban a spermiumok fertilizációs képessége szignifikáns mértékben különbözött a többi hígítótól ($P < 0,001$) (27. ábra). MENDOZA és mtsai (2013) 1,7 mg/ml szeminális plazma kiegészítést alkalmaztak +15°C-ra hűtött kossperma esetében. A peteburok kötődési teszt eredményei alapján a

protein kiegészítés hatására átlagosan 3,17 spermium/petesejt, míg kontroll hígítóban 3,31 spermium/petesejt kötődött, de az eredmények közötti különbség nem volt szignifikáns ($P < 0,05$). CHEN és CHAN (2012) munkájuk során arra a következtetésre jutottak, hogy egérnél alkalmazott IVF esetén, ha a petesejteket $20\mu\text{M}$ kurkumin tartalmú médiumban inkubálták, akkor szignifikáns mértékben csökkent a spermiumok fertilizációs képessége.



28. ábra: A vemhesülési százalék alakulása transzcervikális termékenyítést követően

Az ondóplazmával végzett kísérletben összesen három alkalommal végeztünk transzcervikális termékenyítést. A kísérletben összesen 87 anyajuhot vontunk be, hogy megvizsgáljuk milyen hatása van az ondóplazma protein kiegészítésnek a spermiumok fertilizációs képességére. A kontroll a swim-up médiummal hígított ondó volt. A termékenyítést követő 34. napon rektális ultrahangos vizsgálatot végeztünk a vemhesség megállapítására, melynek eredményeit az 28. ábra szemlélteti. Az első termékenyítést követően mindkét vizsgálati csoportban az anyajuhok 6,7%-nál állapítottunk meg vemhességet. A második termékenyítést követően a kontroll csoport anyáinak 35,7%-a, míg az ondóplazma kiegészítéssel termékenyített anyák 28,5%-a vemhesült. Harmadik alkalommal a két csoport eredményei közel azonosak voltak (kontroll: 31,3%, ondóplazma kiegészítés: 30,8%). Az általunk elért vemhesülési eredményeket továbbá az is befolyásolhatta, hogy a rasa aragonesa egy erősen szezonális fajta, és a szezonon kívül végzett termékenyítés eredményessége gyengébb a tenyészszezonhoz képest. A vemhesülési eredményeket egyik esetben sem befolyásolta

az alkalmazott hígító típusa ($P > 0,01$). LEAHY és mtsai. (2010) fagyasztott kos sperma esetén vizsgálták az ondóplazma kiegészítés hatását és eredményeik szintén azt bizonyították, hogy az ondóplazma kiegészítés nem volt hatással a termékenyülési eredményekre. MAXWELL és mtsai (1999) fagyasztott kosspermával végeztek cervikális termékenyítést, ahol a szeminális plazma kiegészítés hatására a termékenyülési arány 51%, míg a kontroll esetében 28% volt.

5 KÖVETKEZTETÉSEK, JAVASLATOK

A zselatinnal végzett eltartási próbák során arra a következtetésre jutottam, hogy a zselatinnak nincs káros hatása a spermiumokra, de a kontroll tejes hígító eredményeit nem múlta felül. Feltételezhető, hogy a tejben lévő kazeinek és albumin nagy affinitással kötődnek a spermasejtek membránjához, ezáltal hatékony védelmet biztosítanak a hidegsokk ellen.

A zselatin kedvező hatása, mesterséges termékenyítés során lehet jelentős. Cervikális termékenyítés esetén sok esetben problémát okoz az ondó visszafolyása, termékenyítést követően. A probléma ebben az esetben az, hogy a vaginába visszafolyt spermiumoknak több időre van szüksége a cervixen és az uteruson való áthaladáshoz, ami csökkenti a termékenyülés esélyét. A zselatin 30-35°C körüli hőmérsékleten (Bloom számtól és koncentrációtól függően) alakul gélből folyékony halmazállapotúvá, ezért optimális esetben beondozáskor a termékenyítő anyag még gél halmazállapotú, ami megakadályozza a sperma visszafolyását. A cervixben a zselatin folyékony halmazállapotúvá válik, ezáltal a spermiumok számára is biztosít egy folyékony közeget, melyben gyorsabb mozgásra képesek.

A nanoszelénnel végzett takarmánykiegészítés hatására nem tapasztaltunk érdemi változást a vér szeléntartalmában és a sperma minőségi tulajdonságaiban. Az eredmények alapján levonható a következtetés, hogy a takarmányban lévő szelén is képes volt fedezni a normális spermiogenezishez szükséges mennyiséget.

A továbbiakban érdemes lenne a here szöveti állományát is megvizsgálni nanoszelénnel végzett takarmánykiegészítést követően, ugyanis szelén kiegészítés hatására a Sertoli sejtek száma növekszik a here állományában, ami a spermakonzentráció növekedését idézheti elő. Továbbá vizsgálataink során 10 szeminális plazma fehérje-expressziójában találtunk eltérést, melyek közül jelenleg nem ismert minden fehérje szerepe a spermiogenezis folyamatában és hatása a sperma minőségi tulajdonságaira, fertilitásra. A továbbiakban ezen fehérjék szerepét lenne érdemes tanulmányozni.

Eredményeink alapján levonható a következtetés, hogy a csökkenő nappali megvilágítás hatására dorper és fehér dorper fajta esetében nőtt a herekörméret, illetve dorper kosok esetében az ondó sűrűsége, fehér dorpernél az ejakulátum mennyisége. Mindkét fajta esetében megállapítottuk, hogy a spermaminőség minden évszakban megfelelt az ejakulátummal szemben támasztott minimum követelményeknek. Ennek alapján javasolható a kosok egész éven át történő használata. A későbbiekben érdemes

lenne olyan kísérletet végezni, mely azt vizsgálja, hogy mely évszakban a legkedvezőbb a két fajta ondójának fagyaszthatósága.

A szeminális plazma proteinekkal és a kurkuminnal végzett vizsgálat eredményei alapján megállapítottuk, hogy alkalmasak hűtött sperma tároláshoz.

A $+5^{\circ}\text{C}$ -on végzett tárolás során megállapítottuk, hogy a sperma minőségi tulajdonságait sem a kurkumin, sem az ondóplazmaprotein nem befolyásolta jelentősen. In vitro fertilizáció esetén viszont az $1,0\text{nM}$ kurkumin és a $+25\text{ mg/mL}$ szeminális plazma kiegészítés pozitívan hatott az embrionális fejlődésre. Mivel a szeminális plazma proteinek bizonyos frakciói képesek megvédeni a spermasejtek membránját a hidegsokktól, ezért érdemes lenne frakcionált fehérjékkel kísérleteket végezni. Ezáltal meg lehetne határozni, hogy pontosan mely fehérjék képesek a membránszerkezet védelmére.

6 ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK

A dolgozatomban elért eredmények alapján az alábbi új tudományos eredmények állapíthatók meg:

1. Igazoltam, hogy az állati és növényi eredetű zselatin kiegészítésnek nincs negatív hatása a spermaminőségre tej alapú hígító használata esetében, ezért kiegészítőként való alkalmazása javasolható. Továbbá a növényi zselatinok előnye, hogy az állatokra veszélyes kórokozókat (vírusok, prionok) nem tartalmaz.
2. Megállapítottam, hogy a nanoszelénnel végzett takarmánykiegészítés nincs hatással a kosok spermaminőségére és a vér szeléntartalmára, viszont hatással van a szemínális plazmában lévő fehérjék expressziójára.
3. Megállapítottam, hogy a hazánkban is aszezonális szaporodású dél-afrikai dorper és fehér dorper fajták kosainak herekörmérete és spermaminősége az egyes évszakok között az európai fajtákénál kisebb mértékű ingadozást mutat.
4. Megállapítottam, hogy az ondóplazma fehérje és kurkumin kiegészítés nem befolyásolja jelentősen a sperma minőségi tulajdonságait és a transzcervikális termékenyítés során elért vemhesülési eredményeket.

7 AZ EREDMÉNYEK GYAKORLATI HASZNOSÍTHATÓSÁGA

1. A tej alapú hígítóval végzett cervikális termékenyítés továbbra is az egyik leghatékonyabb módja a $+15^{\circ}\text{C}$ vagy $+5^{\circ}\text{C}$ -ra hűtött kossperma felhasználásának.
2. A nanoszelén oldat alkalmas tenyészkosok takarmánykiegészítőként való felhasználásra.
3. Dorper és fehér dorper kosok minden évszakban jó minőségű spermát termelnek, ezért egész éven át javasolható használatuk.
4. Az ondóplazma proteinek és a kurkumin képesek a hidegsokk okozta membránkárosodást csökkenteni, ezért alkalmazhatóak a termékenyítéshez használt hígító összetevőjeként, de pontos hatásmechanizmusok további vizsgálatot igényel.

8 ÖSSZEFOGLALÁS

A mesterséges termékenyítés folyamatában az egyik legnagyobb szerepe a kiválasztott tenyészkosnak van, mert igen nagyszámú utódja által javíthat vagy ronthat az állomány minőségén. Emiatt a tenyészkos kiválasztása során kritikusabban lehet és kell szelektálni a rendelkezésre álló állományt, mint az anyáknál. Amennyiben a kosokat mesterséges termékenyítésre használjuk fel, úgy elengedhetetlen az ondó minőségének bírálata. Az ondó legfontosabb értékmérő tulajdonságai a makroszkópos vizsgálattal megállapítható mennyiség, szag, szín, halmazállapot és pH-érték. Továbbá mikroszkópos, valamint egyéb műszeres vizsgálatokkal megállapítható a tömegmozgás, progresszív motilitás, sűrűség, élő/holt sejtek aránya, akroszóma állapota, DNS károsodás mértéke és a sejtek morfológiája. Jelen dolgozat célja az volt, hogy megállapítsuk mely tényezők befolyásolják leginkább friss és hűtött sperma esetében ezeket a spermaminőségi tulajdonságokat.

Az első kísérlet célja az volt, hogy megállapítsuk, hogy a zselatin tartalmú hígító miként befolyásolja az öt napon át, 5°C-on tárolt kossperma életképességét. A hipotézisünk az volt, hogy ha zselatint adunk a spermahígítókhoz, akkor ötnapos tárolás során a spermiumok tovább megőrzik életképességüket, mint a kontroll hígítóban. A kutatáshoz két alaphígítót használtunk. Az egyik 1,5%-os zsírtartalmú UHT-tej, a másik 1,5%-os zsírtartalmú UHT-tej+5% tojássárgája. Mind a két hígítóhoz 0; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0%-ban adtunk Dr. Oetker lapzselatint. A hígított ejakulátumokat 5 napig +5°C-on tároltuk és 24h-ként mintát vettünk belőlük. A mintákból Kovács-Foote-féle festéssel készítettünk keneteket, amiket fénymikroszkóp segítségével értékeltünk ki. A sejteket öt csoportba soroltuk úgy, mint: élő-ép, élő-sérült akroszómájú, elhalt, élő fejű-elhalt farkú, élő farkú-elhalt fejű. Az eredmények alapján arra a következtetésre jutottunk, hogy a 1,5%-os zsírtartalmú UHT-tej+1,0% lapzselatin, illetve 1,5%-os zsírtartalmú UHT-tej+5% tojássárgája+1,5% zselatinos hígítóban több élő, ép sejt található, mint a kontrollként használt zselatinmentes hígítóban.

A továbbiakban azt vizsgáltuk, hogy a szódium-alginát tartalmú hígító, hogyan befolyásolja a +15°C-ra és +5°C-ra hűtött, 48h-án tárolt kossperma minőségi tulajdonságait. A tej alapú hígítót használtuk kontrollként, melyhez 1,0; 1,5; 2,0% zselatint oldottunk fel. Hűtést követően meghatároztuk a spermiumok motilitását, membránintegritását, kapacitációs státuszát és az apoptikus markereket. Az eredmények alapján arra a következtetésre jutottunk, hogy a zselatin kiegészítés hatással van a

spermiumok motilitására, progresszív motilitására, membránintakt sejtek számára, amennyiben az ondót +5°C-on tároltuk 48h-án át. A +15°C-ra hűtött sperma esetében nem volt különbség a kontroll és zselatin tartalmú hígítónál vizsgált spermaminőségi tulajdonságok között. Az eredmények alapján arra a következtetésre jutottunk, hogy a zselatin tartalmú hígító alkalmas kossperma hűtve tárolására, de a tej alapú hígító eredményeit nem múlta felül.

A második vizsgálat célja az elemi nano-szelén hatásának vizsgálata a spermaminőségre, a vér szeléntartalmára és az ondóplazma fehérje profiljára fehér dorper kosoknál. A spermaminőség esetében meghatároztuk az ondó mennyiségét (mL), sűrűségét ($\times 10^9$), membránintegritását (SYBR14/PI), illetve a vér szeléntartalmát (ppb). A kísérlet 70. napján a szeminális plazma fehérjeprofilját határoztuk meg, majd a kontroll és a szelén csoport között expressziós különbséget mutató fehérjék LC-MS módszerre kerültek beazonosításra. Vizsgálati eredményeink alapján a 0,3 mg/ml nanoszelénnel végzett takarmánykiegészítés nincs hatással a kosok spermaminőségére és a vér szeléntartalmára, viszont hatással van a szeminális plazmában lévő fehérjék expressziójára, mivel 10 fehérje expressziójában mutattunk ki különbséget, melyek egy része a spermiogenezisre van hatással.

A harmadik kísérletben azt vizsgáltam, hogyan változnak dorper és fehér dorper kosok ondójának minőségi és mennyiségi jellemzői és herekörmérete a különböző évszakokban. Hetente egy alkalommal történt műhüvelyes spermavétel fajténként nyolc-nyolc kos bevonásával. Ugratást követően vizsgáltuk az ondó mennyiségét (mL), koncentrációját ($\times 10^9$), a spermiumok tömegmozgását (0-5) és progresszív motilitását (%). Az eredmények alapján megállapítottuk, hogy az évszakok változása hatással van dorper és fehér dorper kosok herekörméretére és spermaminőségére. A csökkenő nappali megvilágítás hatására mindkét fajta esetében nőtt a herekörméret, illetve dorper kosok esetében az ondó sűrűsége, fehér dorpernél az ejakulátum mennyisége.

Az utolsó kísérlet célja, hogy megállapítsuk, miként befolyásolják az ondóplazmaproteinek és a kurkumin a +15°C-ra, +5°C-ra hűtött és 48h-át tárolt kossperma minőségi tulajdonságait, fertilitását. Annak érdekében, hogy pontosabb információink legyen a fehérjék és a kurkumin kiegészítéssel hűtött sperma fertilizációs képességéről pereburok kötődési tesztet (ZBA), mesterséges termékenyítést és in vitro fertilizációt (IVF) is elvégeztünk a hűtött mintákkal. Az eredmények alapján a szeminális plazma kiegészítéssel értük el a legjobb ZBA eredményeket ($P < 0,001$), de a

mesterséges termékenyítés és az in vitro fertilizáció során elért eredmények nem különböztek a kontroll csoport eredményeitől.

9 SUMMARY

When artificial insemination is used as care should be taken by choosing the breeding ram, because by having a large number of successor the male can improve or worsen the quality of the stock. Therefore a more critical selection should be made among breeding rams than it is among the ewes. The evaluation of semen is necessary to be made when the rams are used for artificial insemination. The main parameters as quantity, smell, colour, consistency and pH can be examined by using macroscopic evaluation. Motility, progressive motility, concentration, the number of live/dead cells, acrosome integrity, DNA fragmentation are the parameters can be evaluated by using microscopic or different tools like flow cytometry to evaluate sperm quality and morphology.

The aim of our study was to examine how different gelatin concentrations affect ram semens viability in liquid storage at 5°C for five days. The hypothesis was to test the effect of gelatin by using two different extenders to examine wheater they have a protective effect on ram sperm morphology. In our experiment we used two different semen extenders as: 1.5% UHT milk and 1.5% UHT milk+5% egg yolk by adding 0; 0.5; 1.0; 1.5; 2.0 % Dr. Oetker gelatin to semen extenders. We stored the semen up to five days at 5°C and after every 24 hour we made the samplings. We stained the smeaes with Kovács-Foote staining and evaluated them by light-microscope. The cells were categorized into five groups as: live and intact cells, live cells with injured acrosome, dead cells, live head with dead tails and live tails with dead head. On the fifth day of the experiment the viability was the best in the following semen extenders: 1.5% fat UHT milk+1.0% gelatin and 1.5% fat UHT milk+1.5%, but it was not significant.

In the next two trials we used sodium-alginate gelatin as an extender additive. This study was set out to determine the effect of sodium-alginate based milk extender on ram semen conserved at 5 °C up to 48h and also cooled to 15°C. Milk based extender was used as a control to study the effect of sodium alginate by using the following concentrations 1.0; 1.5; 2.0%. Motility, membrane integrity, capacitation status and apoptotic markers were evaluated to assess in vitro sperm survival. Motility was not affected by the time of storage or by the type of extender. Significant differences ($P<0.05$), were only found in motility, progressive motility and the number of membrane intact cells. There was no difference between the sperm quality paramaters of the control and treated group when semen was refridgerated to 15°C. The results of

this research support the idea that ram semen diluted with gelatin-supplemented milk extender appears to be a promising method for refrigerated ram semen, however using milk based extender without gelatin supplementation still is a better way for the preservation of refrigerated ovine semen for extended periods.

The aim of the second study was to determine the effect of nano selenium treatment as a feed additive on semen quality, bloods selenium content and on the protein profile of White Dorper seminal plasma. Semen quality parameters as motility (mL), concentration ($\times 10^9$), membrane integrity (SYBR14/PI) and blood selenium content (ppb) was assessed. At Day 70 seminal plasma protein profile of the control antreated group was assessed by using 2D-PAGE and the proteins showed different expression among the groups were identified by using LC-MS method. From the results we concluded that 0.3 mg/ml nanoselenium treatment did not had an effect the sperm quality parameters neither blood selenium concentration, although difference was found in the expression of 10 seminal plasma proteins and most of them have an affect on spermiogenesis.

The purpose of the third study was to determine the seasonal fluctuation of sperm parameters and scrotal circumference in mature Dorper and White Dorper rams, under the climatic conditions of Eastern Hungary. Preliminary investigations were carried out with eight Dorper and eight White Dorper. Semen samples were collected with artificial vagina and volume, concentration ($\times 10^9$ /ml), mass motility (0-5), progressive motility (%), scrotal circumference (cm) were determined. Scrotal circumference increased in both breeds when autumn was compared to spring. The semen concentration also increased in autumn at Dorper breed, while in White Dorper the volume of the ejaculate resulted in higher numbers at autumn season.

The aim of the last trial was to examine the effect of seminal plasma protein and curcumin in different concentration on chilled ram semen quality, fertility when semen was cooled to $+15^\circ\text{C}$ and $+5^\circ\text{C}$ and stored up to 48h. To establish whether the protective effect of seminal plasma proteins and curcumin is reflected in the fertilization potential, we performed additional experiments to comparatively determine the influence of seminal plasma proteins and curcumin on the zona pellucida binding assay (ZBA), artificial insemination (AI) and also in vitro fertilization (IVF). The addition of seminal plasma protein before refrigeration resulted in a higher ($P < 0.001$) ZBA value, nevertheless AI and IVF results did not differ among the groups.

10 IRODALOMJEGYZÉK

1. Abdel-Rahman, H.A., El-Beley, M.S., Al-Qarawi, A.A., El-Mougy, S.A. (2000): The relationship between semen quality and mineral composition of semen in various ram breeds. *Small Ruminant Research*. 38. 45-49.
2. Agarwal, A., Makker, K., Sharma, R. (2008): Clinical relevance of oxidative stress in male factor infertility: an update. *American Journal of Reproductive Immunology*. 59. 2–11.
3. Agarwal, A., Prabakaran, S.A. (2005): Mechanism, measurement, and prevention of oxidative stress in male reproductive physiology. *Indian Journal of Experimental Biology*. 43. 963–974.
4. Aitken, R.J. (1997): Molecular mechanisms regulating human sperm function. *Molecular Human Reproduction*. 3. 169–173.
5. Aitken, R.J., Harkiss, D., Knox, W., Paterson, M., Irvine, S. (1998): On the cellular mechanisms by which the bicarbonate ion mediates the extragenomic action of progesterone on human spermatozoa. *Biology and Reproduction*. 58. 186-196.
6. Aitken, R.J., De Iuliis, G.N., Gibb, Z., Baker, M.A. (2012): The simmet lecture: New horizons on an old landscape-oxidative stress, DNA damage and apoptosis in the male germ line. *Reproduction in domestic animals*. 4. 7-14.
7. Aksoy, E., Aktan, T.M., Duman, S., Cuce, G. (2012): Assessment of spermatozoa morphology under light microscopy with different histologic stains and comparison of morphometric measurements. *International Journal of Morphology*. 1544-1550.
8. Akram, M., Uddin, S., Ahmed, A., Usmanghani, K., Hannan, A., Mohiuddin, E., Asif, M. (2010): Curcuma longa and curcumin: a review article. *Romanian Journal of Biology – Plant Bilogy*. 55. 65-70.
9. Albrizio, M., Guaricci, A.C., D'Amico, P., Lacalandra, G.M., Quaranta, A., Zarrilli, A (2005): Influenza del naloxone su vitalita, capacitazione e reazione acrosomiale di spermatozoi di ariete. *Società Italiana di Fisiologia Veterinaria*. VI Congresso Nazionale. Sassari, Italy, June 2-4.
10. Alessandro, A.G.D., Martemucci, G. (2003): Evaluation of seasonal variations of semen freezability in Lecce ram. *Animal Reproduction Science*. 79. 93-102.
11. Aller, J.F., Aguilar, D., Vera, T., Almeida, G.P., Alberio, R.H. (2012): Seasonal variation in sexual behavior, plasma testosterone and semen characteristics of

- Argentine Pampinta and Corriedale rams. *Spanish Journal of Agricultural Research*. 10. 345-352.
12. Alvarez, J.G., Lasso, J.L., Blasco, L., Nuñez, R.C., Heyner, S., Caballero, P.P., Storey, B.T. (1993): Centrifugation of human spermatozoa induces sublethal damage; separation of human spermatozoa from seminal plasma by a dextran swim-up procedure without centrifugation extends their motile lifetime. *Human Reproduction*. 8. 1087-1092.
 13. Alvarez, J.G., Storey, B.T. (1995): Differential incorporation of fatty acids into and peroxidative loss of fatty acids from phospholipids of human spermatozoa. *Molecular Reproduction Development*. 42. 334-346.
 14. Amir, D., Volcani, R. (1965): Seasonal fluctuations in the sexual activity of Awassi, German Mutton Merino, Corriedale, Border Leicester and Dorset Horn rams. II. Seasonal changes in semen characteristics. *Journal of Agricultural Science* 64. 121-125.
 15. Anto, R.J., Mukhopadhyaya, A., Denning, K., Aggarwal, B.B. (2002): Curcumin (diferuloylmethane) induces apoptosis through activation of caspase-8, BID cleavage and cytochrome c release: its suppression by ectopic expression of Bcl-2 and Bcl-xl. *Carcinogenesis*. 23. 143-150.
 16. Austin, C.R. (1951): Observations on the penetration of the sperm in the mammalian egg. *Australian Journal of Scientific Research. Ser. B: Biological Sciences*. 4. 581-596.
 17. Austin, C.R. (1970): Ageing and reproduction: post-ovulatory deterioration of the egg. *Journal of Reproduction and Fertility*. 12. 39-53.
 18. Asadpour, R. (2012): Relationship between mineral composition of seminal plasma and semen quality in various ram breeds. *Acta Scientiae Veterinariae*. 40. 1-8.
 19. Attaran, M., Pasqualotto, E., Falcone, T. (2000): The effect of follicular fluid reactive oxygen species on the outcome of in vitro fertilization. *International Journal of Fertility and Women's Medicine*. 45. 314-320.
 20. Baker, M.A., Hetherington, L., Ecroyd, H., Roman S.D., Aitken, R.J. (2004): Analysis of the mechanism by which calcium negatively regulates the tyrosine phosphorylation cascade associated with sperm capacitation. *Journal of Cell Science*. 117. 211-222.

21. Baldi, E., Casano, R., Falsetti, C., Krausz, Cs., Maggi M., Forti G. (1991): Intracellular calcium accumulation and responsiveness to progesterone in capacitating human spermatozoa. *Journal of Andrology*. 12. 323-330.
22. Baldi, E., Luconi, M., Bonaccorsi, L., Krausz, Cs., Forti G. (1996): Human sperm activation during capacitation and acrosome reaction: Role of calcium, protein phosphorylation and lipid remodelling pathways. *Frontiers in Bioscience*. 1. 189-205.
23. Baldi, E., Luconi, M., Bonaccorsi, L., Muratori, M., Forti, G. (2000): Intracellular events and signaling pathways involved in sperm acquisition of fertilizing capacity and acrosome reaction. *Frontiers in Bioscience*. 5. 110-123.
24. Bansal, A.K., Bilaspuri, G.S. (2008): Effect of manganese on bovine sperm motility, viability, and lipid peroxidation in vitro. *Animal Reproduction Science*. 5. 90-96.
25. Bansal, A.K., Bilaspuri, G.S. (2009): Antioxidant effect of vitamin E on motility, viability and lipid peroxidation of cattle spermatozoa under oxidative stress. *Animal Science Papers and Reports*. 27. 5-14.
26. Bansal, A.K., Bilaspuri, G.S. (2007): Effect of ferrous ascorbate on in vitro capacitation and acrosome reaction in cattle bull spermatozoa. *Animal Science Report*. 1. 69–77.
27. Barrios, B., Fernandez-Juan, M., Muiño-Blanco, T., Cebrián-Pérez J.A. (2005): Immunocytochemical localization and biochemical characterization of two seminal plasma proteins that protect ram spermatozoa against cold shock. *Journal of Andrology*. 26. 539-549.
28. Barrios, B., Perez-Pé, R., Gallego, M., Tato, A., Osada, J., Muiño-Blanco, T., Cerian-Pérez, A. (2000): Seminal plasma proteins revert the cold-shock damage on ram sperm membrane. *Biology of Reproduction*. 63. 1531-1537.
29. Batellier, F., Magistrini, M., Fauquant, J., Palmer, E. (1997): Effect of milk fractions on survival of equine spermatozoa. *Theriogenology*. 48. 391-417.
30. Becze, J. (1983): A hímivarú állatok szaporodásbiológiája. *Mezőgazda Kiadó Budapest*. 241.
31. Behrens, W.A., Thompson, J.N., Madere, R. (1982): Distribution of alpha-tocopherol in human plasma lipoproteins. *American Journal of Clinical Nutrition*. 35. 691-696.

32. Bergeron, A., Brindle, Y., Blondin, P., Manjunath, M. (2007): Milk caseins decrease the binding of the major bovine seminal plasma proteins to sperm and prevent lipid loss from the sperm membrane during sperm storage. *Biology of Reproduction*. 77. 120-126.
33. Blackshaw, A.W. (1960): The effect of milk diluents on the viability of ram spermatozoa and their revival after freezing. *Australian Veterinary Journal*. 36. 432-435.
34. Blaschuk, O., Burdzy, K., Fritz, I.B. (1983): Purification and characterization of a cell-aggregating factor (clusterin), the major glycoprotein in ram rete testis fluid. *Journal of Biology and Chemistry*. 258. 7714-7720.
35. Boland, M.P., Al-Kamali, A.A., Crosby, T.F., Haynes, N.B, Howles, C.M., Kelleher, D.L., Gordon, I. (1985): The influence of breed, season and photoperiod on semen characteristics, testicular size, libido and plasma concentrations in rams. *Animal Reproduction Science*. 9. 241-252.
36. Bradford, M.M. (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. 72. 248-254.
37. Brown, M., Wittwer, C (2000): Flow cytometry: Principles and clinical applications in hematology. *Clinical Chemistry*. 46. 1221-1229.
38. Bucak, M.N., Baspinar, N., Tuncer, P.B., Cayan, K., Sariözkan, S., Akalin, P.P., Buyukleblebici, S., Kucukgunay S. (2012): Effects of curcumin and dithioerythritol on frozen-thawed bovine semen. *Andrologia*. 44. 102-109.
39. Bucak, M.N., Ateşşahin, A., Yüce, A. (2008): Effect of antioxidants and oxidative stress parameters on ram semen after the freeze-thawing process. *Small Ruminant Research*. 75. 128–134.
40. Bucak, M.N., Ateşşahin, A., Varişli, O., Yüce, A., Tekin, N., Akçay, A. (2007): The influence of trehalose, taurine, cysteamine and hyaluron on ram semen. Microscopic and oxidative stress parameters after freeze-thawing process. *Theriogenology*. 67. 1060–1067.
41. Bucak, M.N., Sariözkan, S., Tuncer, P.B. (2010): The effect of antioxidants on post-thawed Angora goat (*Capra hircus ancyrensis*) sperm parameters, lipid peroxidation and antioxidant activities. *Small Ruminant Research*. 89. 24–30.
42. Bucak, M.N., Tuncer, P.B., Sariözkan, S., Ulutas, P.A. (2009): Comparison of the effects of glutamine and an amino acid solution on post-thawed ram sperm

- parameters, lipid peroxidation and antioxidant activities. *Small Ruminant Research*. 81. 13-17.
43. Budai, Cs., Oláh J., Egerszegi, I., Jávora, A., Kovács, A. (2013): Scrotal circumference and semen characteristics of Dorper rams in different seasons. A jövő tudósai - a vidék jövője" - PhD konferencia. Debrecen. 30. november 2012.
 44. Bungum, M. (2012): Sperm DNA Integrity Assessment: A New Tool in Diagnosis and Treatment of Fertility. *Obstetrics and Gynecology International*. 2012. 1- 6.
 45. Cabiscol, E., Tamarit, J., Ros J. (2000): Oxidative stress in bacteria and protein damage by reactive oxygen species. *International Microbiology*. 3. 3-8.
 46. Cardozo, J.A., Fernández-Juan, M., Forcada, F., Abecia, A., Muiño-Blanco, T., Cebrián-Pérez, J.A. (2006): Monthly variations in ovine seminal plasma proteins analyzed by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. *Theriogenology*. 66. 841-850.
 47. Chang, MC. (1951): Fertilizing capacity of spermatozoa deposited into the fallopian tubes. *Nature*. 168. 697–698.
 48. Chen, C.S., Chao, H.T., Pan, R.L., Wei, Y.H. (1997): Hydroxyl radical-induced decline in motility and increase in lipid-peroxidation and DNA modification in human sperm. *International Journal of Biochemistry and Molecular Biology*. 43. 291–303.
 49. Chen, C.C., Chan, W. H. (2012): Injurious effects of curcumin on maturation of mouse oocytes, fertilization and fetal development via apoptosis. *International Journal of Molecular Science*. 13. 4655-4672.
 50. Chenoweth, P.J. (2005): Genetic sperm defects. *Theriogenology*. 64. 457-468.
 51. Colas, G., Courot, M. (1977): Production of spermatozoa, storage of semen and artificial insemination in sheep. *Management of reproduction in sheep and goats, Symposium, Madison, Wisconsin*. July, 24-31.
 52. Choong, C.H., Wales, R.G. (1962): The effect of cold shock on spermatozoa. *Australian Journal of Biology Science*, 15. 543-551.
 53. Corcini, C.D., Moreira, F., Pigozzo, R., Varela, A.S., Torres, N.U., Lucia, T. (2011): Semen quality and reproductive performance after artificial insemination with boar sperm stored in gelatin-supplemented extender. *Livestock Science*. 138. 289-292.

54. Cordelli, E.C., Eleuteri, P., Leter, G., Resica, M., Spano, M. (2005): Flow cytometry applications in the evaluation of sperm quality: semen analysis, sperm function and DNA integrity. *Contraception*. 74. 273-279.
55. Cortell, C., Viudes de Castro, M. P. (2008): Effect of gelatin addition to freezing extender on rabbit semen parameters and reproductive performance. In 'Proceedings of the 9th World Rabbit Congress, Verona, Italy'. (Eds G. Xicatto, A. Trocino and S.D. Lukefahr.) 327–332.
56. Cournock, R.M., Reed, H.C.B., Logue, D.N., Maxwell, W.M.C. (1984): Artificial insemination of ewes with ram semen frozen by the pellet method. *Animal Production Science*. 38. 546.
57. Cseh, S., Solti, L. (2001): Studies on factors affecting superovulation and embryo transfer in Hungarian Merino ewes. *Acta Veterinaria Hungarica*. 49. 431-441.
58. Czakó, J. (1978): *Gazdasági állatok viselkedése*. Mezőgazdasági Kiadó, Budapest. 218.
59. Danshina, P.V., Geyer, C.B., Dai, Q., Goulding, E.H., Willis, W.D., Kitto, G.B., McCarrey, J.R., Eddy, E.M., O'Brien, D.A. (2010): Phosphoglycerate kinase 2 (PGK2) is essential for sperm function and male fertility in mice. *Biology and Reproduction*. 82. 136-145.
60. Darley-Usmar, V., Wiseman, H., Halliwell, B. (1995): Nitric oxide and oxygen radicals: a question of balance. *FEBS Letters*. 369. 131–135.
61. De Jonge, C.J., Barratt, C.L.R. (2006): *The sperm cell production, maturation, fertilization, regeneration*. Cambridge University Press. 351.
62. De Lamirande, E., Gagnon, C. (1993): A positive role for the superoxide anion in triggering hyperactivation and capacitation of human spermatozoa. *International Journal of Andrology*. 16. 21–25.
63. De Lamirande, E., Leclerc, P., Gagnon, C. (1997): Capacitation as a regulatory event that primes spermatozoa for the acrosome reaction and fertilization. *Molecular Human Reproduction*. 3. 175–194.
64. Del Valle, I., Gomez-Duran, A., Holt, W.V., Muiño-Blanco, T., Cebrian-Pérez, J.A. (2012): Soy Lecithin Interferes With Mitochondrial Function in Frozen-Thawed Ram Spermatozoa. *Journal of Andrology*. 33. 717-725.
65. Den Daas, J.H., DeJong, G.G., Lansbergen, L., Van Wagendonk-De Leeuw, A.M. (1998): The relationship between the number of spermatozoa inseminated and the

- reproductive efficiency of individual bulls. *Journal of Dairy Science*. 81. 1714-1723.
66. Desai, N., Sharma, R., Maker, K., Sabnegh, E., Agarwal, A. (2009): Physiological and pathological levels of reactive oxygen species in neat semen of infertile men. *Fertility and Sterility*. 92. 1626–1631.
 67. Desai, N.R., Mahfouz, R., Sharma, R., Gupta, S., Agarwal, A. (2010): Reactive oxygen species levels are independent of sperm concentration, 4 motility, and abstinence in a normal, healthy, proven fertile man: a longitudinal study. *Fertility and Sterility*. 94. 1541–1543.
 68. Dimanov, D., Raichev, S., Slavov, R., Atanasov, V. (1989): Glutathione peroxidase activity and level of selenium in blood of sheep reared in different regions of bulgaria. *Zhivotonov dni Nauki*. 26. 90-95.
 69. Dot, H.M., Harrison, R.A.P., Foster, G.C.A. (1979): The maintenance of motility and the surface properties of epididymal spermatozoa from bull, rabbit and ram in homologous seminal and epididymal plasma. *Journal of Reproductive Fertility*. 62. 113–124.
 70. Druart, X., Rickard, J.P., Mactier, S., Kohnke, P.L., Kershaw-Young, C.M., Bathgate, R., Gibb, Z., Crossett, B., Tsikis, G., Labas, V., Hairchaux, G., Grupen, C.G., de Graaf, S.P. (2013): Proteomic characterization and cross species comparison of mammalian seminal plasma. *Journal of Proteomics*. 91. 13-22.
 71. Dubé, C., Beaulieu, M., Reyes-Moreno, C., Guillemette, C., Bailey, J.R. (2004): Boar sperm storage capacity of BTS and Androhep Plus: viability, motility, capacitation, and thyrosine phosphorylation. *Theriogenology*. 62. 874-886.
 72. Egerszegi, I., Sarlós, P., Molnár, A., Cseh, S., Rátky, J. (2011): Az évszak és az életkor hatása fekete racka kosok spermatermelésére. *AWETH*. 7. 4. 119-127.
 73. Einarsson, S., Swensson, T., Viring, S. (1971): A field trial on the fertility of deep frozen boar spermatozoa. *Nord. Vet. Med.* 25.372-376.p. In.: Makkossné-Petz, B. (2007): Mélyhűtött sperma termékenyítőképességének beclése in vitro körülmények között. PhD. disszertáció. Mosonmagyaróvár. 10.
 74. El-Darawany, A.A. (1999): Improving semen quality of heat stressed rams in Egypt. *The Indian Journal of Animal Sciences*. 69. 1020-1023.
 75. Elmore, S. (2007): Apoptosis: A review of programmed cell death. *Toxicologic Pathology*. 35. 495-516.

76. Esbenshade, K.L., Nebel, R.L., (1990): Encapsulation of porcine spermatozoa in poly-lysine microspheres. *Theriogenology*. 33. 499–508.
77. Eszenyi, P., Sztrik, A., Babka, B., Prokisch, J. (2011): Production of Lactomicrosel and nanosize (100-500NM) selenium spheres by probiotic lactic acid bacteria. 2011 International Conference on Food Engineering and Biotechnology IPCBEE. 9. 97-101.
78. Evans, G., Maxwell, W.M.C. (1987): Salamons artificial insemination of sheep and goats. Butterworths Pty Ltd. Sydey, 85.
79. Foote, R.H., Brockett, C.C., Kaproth, M.T. (2002): Motility and fertility of bull sperm in whole milk extender containing antioxidants. *Animal Reproduction Science*. 71. 13-23.
80. Fouchecourt, S., Charpigny, G., Reinaud, P., Dumont, P., Dacheux, J.L. (2002): Mammalian lipocalin-type prostaglandin D2 synthase in the fluids of the male genital tract: putative biochemical and physiological functions. *Biology of Reproduction*. 66. 458-467.
81. Fourie, P.J., Schwalbach, L.M., Naser, F.W.C., Van der Westhuizen, C. (2004): Scrotal, testicular and semen characteristics of young Dorper rams managed under intensive and extensive conditions. *Small Ruminant Research*. 54. 53-59.
82. Gábor, Gy., Nagy, Sz., Szász, F., Szigeti E., Solymosi, N. (2002): Comparative semen motion analysis by two computer assisted methods in AI bulls. *Biology of Reproduction*. 66. 289.
83. Gadella, B.M., Tsai, P.S., Boerke, A., Brewis, I.A. (2008): Sperm head membrane reorganisation during capacitation. *International Journal of Developmental Biology*. 52. 473-480.
84. Gagnon, C., Iwasaki, A., De Lamirande, E., Kovalski, N. (1991): Reactive oxygen species and human spermatozoa. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 637. 436–444.
85. García-López, N., Ollero, M., Muñio-Blanco, T., Cebrián-Pérez, J.A. (1996): A dextran swim-up procedure for separation of highly motile and viable ram spermatozoa from seminal plasma. *Theriogenology*. 46. 141-151.
86. Garrido, N., Meseguer, M., Simon C. (2004): Proxidative and antioxidative imbalance in human semen and its relation with male infertility. *Asian Journal of Andrology*. 6. 59–65.

87. Gavella, M., Lipovac V. (1992): NADH-dependent oxidoreductase (diaphorase) activity and isozyme pattern of sperm in infertile men. *Archives of Andrology*. 28. 135–141.
88. Gergátz, E. (2007): Juhok mesterséges termékenyítése. In. *Házi emlősállatok mesterséges termékenyítése*. 2007. Szerk. Pécsi T., Budapest, Mezőgazda Kiadó. 335-377.
89. Gharagozlo, P., Aitken, R.J. (2011): The role of sperm oxidative stress in male infertility and the significance of oral antioxidant therapy. *Human Reproduction*. 26. 1628-1640.
90. Ghazvinian, K., Jamsheedi, R., Taghipour Bazargani, T., Salar, N.A. (2005): Evaluation of selenium in blood of sheep and goats in semnan province. *Journal of Agricultural Sciences and Natural Resources*. 12. 1-6.
91. Gillan, L., Evans, G., Maxwell, W.M.C. (1997): Capacitation status and fertility of fresh and frozen-thawed ram spermatozoa. *Reproductive Fertility and Development*. 9. 481-487.
92. Gonçalves, F., Barretto, L.S.S., Arruda, R.P., Perri, S.H.V., Mingoti, G.Z. (2010): Effect of antioxidants during bovine in vitro fertilization procedures on spermatozoa and embryo development. *Reproduction in Domestic Animals*. 45. 129–135.
93. Graham, J.K. (1994): Effect of seminal plasma on the motility of the epididymal and ejaculated spermatozoa of the ram and bull during the cryopreservation process. *Theriogenology*. 41. 1151–1162.
94. Grasa, P., Cebrián-Pérez, J.A., Muiño-Blanco, T. (2006): Signal transduction mechanism involved in in vitro ram sperm capacitation. *Reproduction*. 132. 721-732.
95. Grasa, P., Colas, C., Gallego, M., Moneagudo, L., Muiño-Blanco, T., Cebrián-Pérez, J.A. (2009): Changes in content and localization of proteins phosphorylated at tyrosine, serine and threonine residues during ram sperm capacitation and acrosome reaction. *Reproduction*. 137. 655-667.
96. Grasa, P., Pérez-Pé, R., Báguena, O., Forcada, F., Abecia, A., Cebrián-Pérez, J.A., Muiño-Blanco, T. (2004): Ram sperm selection by a dextran/swim-up procedure increases fertilization rates following intrauterine insemination in superovulated ewes. *Journal of Andrology*. 6. 982-990.

97. Gunnarsson, M., Lecander, I., Abrahamsson, P.A. (1999): Factors of the plasminogen activator system in human testis, as demonstrated by in situ hybridization and immunohistochemistry. *Molecular Human Reproduction*. 5. 934-940.
98. Gyimóthy, G. (2011): Különböző genotípusú nőivarú juhok szaporodási szezonálisitása. Doktori értekezés. Debreceni Egyetem. 101.
99. Hallagin, A.E.G. (2009): Cellular apoptosis and proliferation in tested of fathead minnow exposed to wastewater treatment plant effluent. Master Thesis. University of Colorado. 46.
100. Hallap, T., Nagy, S., Jaakma, U., Johannisson, A., Rodriguez-Martinez, H. (2005): Mitochondrial activity of frozen-thawed spermatozoa assessed by MitoTracker Deep Red 633. *Theriogenology*. 63. 2311-2322.
101. Halliwell, B. (1994): Free radicals and antioxidants: a personal view. *Nutrition Reviews*. 52. 253-265.
102. Haraszti, J. (1987): A háziállatok szülészete és szaporodásbiológiája. Mezőgazda Kiadó, Budapest. 193.
103. Harrison, R.A.P, Dott, H.M., Foster, G.C. (1978): Effect of ionic strength, serum albumin and other macromolecules on the maintenance of motility and the surface of mammalian spermatozoa in a simple medium. *Journal of Reproduction and Fertility*. 52. 65-73.
104. Harrison, R.A.P., Vickers, S.E. (1990): Use of fluorescent probes to assess membrane integrity in mammalian spermatozoa. *Journal of Reproduction Fertility*. 88. 343-352.
105. Hendin, B.J., Kolettis, P.N., Sharma, R.K., Thomas, A.J., Agarwal, A. (1999): Varicocele is associated with elevated spermatozoal reactive oxygen species production and diminished seminal plasma antioxidant capacity. *Journal of Urology*. 161. 1831-1834.
106. Hirai, M., Cerbito, W.A., Wijayagunawardane, M.P., Braun, J., Leidl, W., Ohosaki, K., Matusuzawa, T., Miyazawa, K., Sato, K (1997): The effect of viscosity of semen diluents on motility of bull spermatozoa. *Theriogenology*. 47. 1463-1478.
107. Hoeben, E., Van Aelst, I., Swinnen, J.V., Opdenakker, G., Verhoeven, G. (1996): Gelatinase A secretion and its control in peritubular and Sertoli cell cultures: effects of hormones, second messengers and inducers of cytokine production. *Molecular Cell Endocrinology*. 118. 37-46.

- 108.Holt, W.V., North, R.D. (1984): Partially irreversible cold-induced lipid phase transitions in mammalian sperm plasma membrane domains: freeze-fracture study. *Journal of Experimental Zoology*. 230. 473–483.
- 109.Holt, W.V., O'Brien, J., Abaigar, T. (2007): Applications and interpretation of computer-assisted sperm analyses and sperm sorting methods in assisted breeding and comparative research. *Reproduction, Fertility and Development*. 19. 709-718.
- 110.Horváth, M. (1983): A kos és kecskebak andrológiája. In: A hímivarú állatok szaporodásbiológiája. Szerk.: Becze, J. Mezőgazdasági Kiadó, Budapest, 173.
- 111.Horváth, M., Menger, H., Bogdan, T.A. (1982): A juhok mesterséges termékenyítése, a kossperma mélyhűtése. In: Becze, J. (1982). *Tanulmányok a haszonállatok szaporításáról*. 211-227.
- 112.Huang, S.Y., Tu, C.F., Liu, S.H., Kuo, Y.H. (2005): Motility and fertility of alginate encapsulated boar spermatozoa. *Animal Reproduction Science*. 87. 111-120.
- 113.Inoue, N., Ikawa, M., Isotani, A., Okabe, M. (2005): The immunoglobulin superfamily protein Izumo is required for sperm to fuse with eggs. *Nature*. 434. 234-238.
- 114.Irvine, D.S. (1996): Glutathione as a treatment for male infertility. *Reviews of Reproduction*. 1. 6–12.
- 115.Ivanova, M., Mollova, M. (1993) Zona-penetration in vitro test for evaluating boar sperm fertility. *Theriogenology*. 40. 397–410.
- 116.Jaruga, E., Sokal, a., Chrul, S., Bartosz, G. (1998): Apoptosis-independent alterations in membrane dynamics induced by curcumin. *Experimental Cell Research*. 15. 303-312.
- 117.Jávor, A., Kukovics, S., Molnár, Gy. (2006): *Juhtenyésztés A-tól Z-ig*. Mezőgazda Kiadó. Budapest. 376.
- 118.Jobim, M.I.M., Oberst, E.R., Salbego, C.G., Souza, D.O., Wald, V.B., Tramontina, F. (2004): Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis of bovine seminal plasma proteins and their relation with semen freezability. *Theriogenology*. 15. 255-266.
- 119.Jobim, M.I.M., Oberst, E.R., Salbego, C.G., Wald, V.B., Horn, A.P., Mattos, R.C. (2005): BSP A1/A2-like proteins in ram seminal plasma. *Theriogenology*. 63. 2053-2026.

120. Juyena, N.S., Stelletta, C. (2012): Seminal plasma: An essential attribute to spermatozoa. *Journal of Andrology*. 33. 536-551.
121. Kafi, M., Safdarian, M., Hashemi, M. (2004): Seasonal variation in semen characteristics, scrotal circumference and libido of Persian Karakul rams. *Small Ruminant Research* 54. 133-139.
122. Kapoor, L.D. (1990): *Handbook of Ayurvedic Medicinal Plants*, CRC Press, Boca Raton, Florida. 185.
123. Karagiannidis, A., Varsakeli, S., Alexopoulos, C., Amarantidis, I. (2000): Seasonal variation in semen characteristics of Chios and Friesian rams in Greece. *Small Ruminant Research* 37. 125-130.
124. Kasimanickam, R., Kasimanickam, V., Pelzer, K.D., Dascanio, J.J. (2007): Effect of breed and sperm concentration on the changes in structural, functional and motility parameters of ram-lamb spermatozoa during storage at 4°C. *Animal Reproduction Science*. 101. 60-73.
125. Kendall, N.R., McMullen, S., Green, A., Rodway, R.G. (2000): The effect of zinc, cobalt and selenium soluble glass bolus trace element status and semen quality of ram lambs. *Animal Reproduction Science*. 62. 277-283.
126. Kerr, J.F.R., Wyllie, A.H., Currie, A.R. (1972): Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Journal of Cancer* 26. 239-257.
127. Kim, J.G., Parthasarathy, S. (1998): Oxidation and the spermatozoa. *Seminars in Reproduction Medicine*. 16. 235-339.
128. Kiss, J. (2007): Szócikkek A-Z. In.: *Biológiai kislexikon*. <http://www.tankonyvtar.hu/biologia/oxford-typotex-biologiai-080905> (2010.12.14.)
129. Kovács, A., Foote, H. (1992): Viability and acrosome staining of bull, boar and rabbit spermatozoa. *Biotechnology and Histochemistry*. 67. 119-124.
130. Kovács, B., Prokisch, J., Győri, Z., Balla, A., Kovács, A., Palencsár, J. (2000): Studies on soil sample preparation for inductively coupled plasma atomic emission spectrometry analysis. *Communication in Soil Science and Plant Analysis*. 31. 1949-1963.
131. Kovács, Gy., Fehér, Gy. (1973): *Fejlődéstan*. Mezőgazda Kiadó, Budapest. 494.

- 132.Kovács, A., Kukovics, S., Jávora, A. (2008): Dorpers, the meat sheep of the future. *Analele Universita din Oradea. Fascicula: Ecotoxicologie, Zootehnie si Tehnologii de Industrie Alimentara, VolumeVII. Anul 7. 272-275.*
- 133.Kölliker (1856): cit. Drevius L.O. (1963): Spiralization in tails of mammalian spermatozoa in hypotonic media. In.: Nagy Sz. (2002): Emlős-spermiumok membránintegritás-vizsgálatai. *Állattenyésztés és takarmányozás. 51.6.607-616.*
- 134.Kukovics, S., Gergátz, E. (2009): A juh mesterséges termékenyítése üzemekben. *Magyar Állatorvosok Lapja 131. 21-26.*
- 135.Kunchandy, E., Rao, M.N.A. (1990): Oxygen radical scavenging activity of curcumin. *International Journal of Pharmaceutics. 58. 237–240.*
- 136.Kútvölgyi, G., Stefler, J., Kovács, A. (2006): Viability and acrosome staining of stallion spermatozoa by Chicago sky blue and Giemsa. *Biotechnology and Histochemistry. 81. 109-117.*
- 137.Lategan, D. (2004): Dorpers. Into the new century. Brochure & Training Manual. Dorper Sheep Breeders' Society of SA, & Dolf Lategan. 5-9.
- 138.Látits, Gy. (2011): Ivarzás, mesterséges termékenyítés. http://www.atk.hu/?cat=szakk_2&i=193 (2014.06.21.)
- 139.Leahy, T., Evans, G., Maxwell, W.M.C., Marti, J.I. (2010): Seminal plasma proteins do not consistently improve fertility after cervical insemination of ewes with non sorted or sex-sorted frozen thawed ram spermatozoa. *Reproduction, Fertility and Development. 22. 606-612.*
- 140.López-Gatius, F., Sances, G., Sancho, M., Yániz, J., Santolaria, P., Gutiérrez, R., Núñez, M., Soler, C. (2005): Effect of solid storage at 15°C on the subsequent motility and fertility of rabbit semen. *Theriogenology. 64. 252-260.*
- 141.Luconi, M., Baldi, E., Krausz, Cs., Forti, G. (1996): Extra cellular calcium negatively modulates tyrosine phosphorylation and tyrosine kinase activity during capacitation of human spermatozoa. *Biology of Reproduction. 55. 207-216.*
- 142.Mandiki, S.N.M., Derycke, G., Bister, J.L., Paquay, R. (1998): Influence of season and age on sexual maturation on parameters of Texel, Suffolk and Ile-de-France rams. I. Testicular size, semen quality and reproductive capacity. *Small Ruminant Research. 28. 67–79.*
- 143.Manjunath, P. (2012): New insights into the understanding of the mechanism of sperm protection by extender components. *Animal Reproduction. 9. 809-815.*

144. Manjunath, P., Sairam, M.R. (1987): Purification and biochemical characterization of three major acidic proteins (BSP-A1, BSP-A2, and BSP-A3) from bovine seminal plasma. *Journal of Biochemistry*. 241. 685-692.
145. Masters, D. G., Fels, H. E. (1984): Seasonal changes in the testicular size of grazing rams. *Animal Production in Australia*. 15. 444-447.
146. Marai I.F.M., El- Darawany, A.A., Fadiel, A., Abdel-Hafez, M.A.M. (2007): Physiological traits as affected by heat stress in sheep – A review. *Small Ruminant Research*. 71. 1-12.
147. Martí, E., Pérez-Pé, R., Colás, C., Muiño-Blanco, T., Cebrián-Pérez, J.A. (2008): Study of apoptosis-related markers in ram spermatozoa. *Animal Reproduction Science*. 106. 113-132.
148. Martínez-Pastor, F., Campuzano, M.M., Álvarez-Rodríguez, M., Álvarez, M., Anel, L., De-Paz, P. (2010): Probes and techniques for sperm evaluation by flow cytometry. *Reproduction in Domestic Animals*. 45. 67-78.
149. Martinez-Pastor, F, Aisen, E, Fernandez-Santos, M.R, Estes, M.C, Maroto-Morales, A, Garcia-Alvarez, O, Garde, J.J. (2009): Reactive oxygen species generators affect quality parameters and apoptosis markers differently in red deer spermatozoa. *Reproduction*. 137. 225-235.
150. Maxwell, W.M.C., De Graaf, S.P., Ghaoui, Re-H., Evans, G. (2007): Seminal plasma effects on sperm handling and female fertility. *Society of Reproduction and Fertility Supplement*. 64. 13–38.
151. Maxwell, W.M.C., Evans, G., Mortimer, S.T., Gillian, L., Gellatly E.S., McPhie, C.A. (1999): Normal fertility in ewes after cervical insemination with frozen-thawed spermatozoa supplemented with seminal plasma. *Reproduction and Fertility Development*. 11.123-126.
152. Maxwell, W.M.C., Welch, G.R., Johnson, L.A. (1997): Viability and membrane integrity of spermatozoa after dilution and flow cytometric sorting in the presence or absence of seminal plasma. *Reproduction, Fertility and Development*. 8. 1165–1178.
153. Mendoza, N., Casao, A., De Valle, I., Serrano, E., Nicolau S, Asumpcao, M.E.O.A., Muiño-Blanco, T., Cebrián-Pérez, J.A., Pérez-Pé, R. (2012): Quality characteristics and fertilizing ability of ram sperm subpopulations separated by partition in an aqueous two-phase system. *Journal of Chromatography B*. 8. 74-81.

154. Mendoza, N., Casao, A., Pérez-Pé, R., Cebrián-Pérez, J.A., Muiño-Blanco T. (2013): New insights into the mechanism of ram sperm protection by seminal plasma proteins. *Biology of Reproduction*. 88. 1-15.
155. Menon, V.P., Sudheer, A.R. (2007): Antioxidant and anti-inflammatory properties of curcumin. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 595. 105-125.
156. Metayer, S., Dacheux, F., Dacheux, J.L., Gatti, J.L. (2002): Comparison, characterization, and identification of proteases and protease Inhibitors in epididymal fluids of domestic mammals: matrix metalloproteinases are major fluid gelatinases. *Biology of Reproduction*. 66. 1219–1229.
157. Miki, K., Clapham, D.E. (2013): Rheotaxis guides mammalian sperm. *Current Biology*. 23. 443-452.
158. Milne, C. (2000): The history of the Dorper sheep. *Small Ruminant Research* 36. 99-102.
159. Miller, D.J., Macek, M.B., Shur, B.D. (1992): Complementary between sperm surface beta-1,4-galactosyltransferase and egg-coat ZP3 mediates sperm-egg binding. *Nature*. 18. 589-593.
160. Milovanov, V. K. 1937. Insemination of sheep with gelatinized semen. *Animal Husbandry*. 10. 53-58.
161. Motterlini, R., Foresti, R., Bassi, R., Green, C.J. (2000): Curcumin an antioxidant and anti-inflammatory agent, induces heme oxygenase-1 and protects endothelial cells against oxidative stress. *Free Radical Biology and Medicine*. 28. 1303-1312.
162. Mortimer, D. (1994): Laboratory standards in routine clinical andrology. *Reproductive Medicine Review*. 3. 97-111.
163. Mortimer, D., Mortimer, S.D. (2013): Computer-Aided Sperm Analysis (CASA) of sperm motility and hyperactivation. *Methods in Molecular Biology*. 927. 77-87.
164. Nagy, SZ. (1998): A spermiumok morfológiai vizsgálatának szerepe a gyakorlatban – *Holstein Magazin*. 4. 32.
165. Nagy, SZ., Házás G., Bali-Papp, Á., Iváncsics, J., Szász, F., Kovács, A., Foote, R.H. (1999): Evaluation of sperm tail membrane integrity by light microscopy. *Theriogenology*. 52. 1153-1159.
166. Nagy, SZ., Sinkovics, GY., Kovács, A. (2002): Viability and acrosome integrity of rabbits spermatozoa processed in gelatin-supplemented extender. *Animal Reproduction Science*. 70. 283-286.

167. Naz, R.K., Rajesh, P.B. (2004): Role of tyrosine phosphorylation in sperm capacitation/acrosome reaction. *Reproductive Biology and Endocrinology*. 75. 1-12.
168. Nel, J.A. (1993): History of the Dorper. Published by the Dorper Sheep Breeder's Society of South Africa, P.O. Box 26, Middelburg 5900, South Africa.
169. Nilsson, L. (1990): A child is born. Bantam Doubleday. 156.
170. Oláh, J. (2010): A juhondó minőségét befolyásoló tényezők. Doktori értekezés. Debreceni Egyetem. 150.
171. Oláh, J., Fazekas, G., Vass, N., Pécsi, A., Kovács, A., Jávor, A. (2008): Dorper kosok nyáron végzett ondóvizsgálata. In: Kukovics, S., Jávor, A. (szerk.): A juhtenyésztés jelene és jövője az EU-ban. ISBN: 978-963-8030-58-0 Licium Art Kiadó, Debrecen. 337-346.
172. Oláh, J., Kusza, Sz., Harangi, S., Posta, J., Kovács, A., Pécsi, A., Budai, Cs., Jávor, A. (2013): Seasonal changes in scrotal circumference, the quantity and quality of ram semen in Hungary. *Archiv Tierzucht*. 56. 102-108.
173. Ollero, M., García-López, N., Cebrián-Pérez, J.A., Muiño-Blanco, T. (1997): Surface changes of ram spermatozoa by adsorption of homologous and heterologous seminal plasma proteins revealed by partition in an aqueous two-phase system. *Reproduction, Fertility and Development*. 9. 381-390.
174. Ollero, M., Muiño-Blanco, T., López-Pérez, M.J., Cebrián-Pérez, J.A. (1996): Viability of ram spermatozoa in relation to the abstinence period and successive ejaculations. *International Journal of Andrology*. 19. 287-292.
175. O'Shea, T., Wales, R.G. (1966): Effect of casein, lecithin, glycerol, and storage at 5°C on diluted ram and bull semen. *Australian Journal of Biology Science*. 19. 871-882.
176. Ochsendorf, F.R. (1999): Infections in the male genital tract and reactive oxygen species. *Human Reproduction Update*. 5. 399-420.
177. Olivera-Muzante, J., Fierro, S., Gil, J. (2011): Conception rates in ewes after AI with ram semen preserved in milk-egg yolk extenders supplemented with glycerol. *Reproduction of Domestic Animals*. 46. 508-512.
178. Paasch, U., Grunewald, S., Agarwal, A., Glandera, H. J. (2004): Activation pattern of caspases in human spermatozoa. *Fertility and Sterility*. 81. 802-809.

179. Paulenz, H., Söderquist, L., Pérez-Pé, R., Berg, K.A. (2002): Effect of different extenders and storage temperatures on sperm viability of liquid ram semen. *Theriogenology*. 57. 823-836.
180. Patrat, C., Serres, C., Jouannet, P. (2000): The acrosome reaction in human spermatozoa. *Biology of the Cell*. 92. 255-266.
181. Pelyhe, CS., Mézes, M. (2013): Myths and facts about the effects on nano-selenium in farm animals-mini review. *European Chemical Bulletin*. 2. 1049-1052.
182. Pervaiz, S., Brew, K. (1987): Homology and structure function correlation between 1-acid glycoprotein and serum retinol-binding protein and its relatives. *FASEB Journal*. 1. 209-214.
183. Pécsi, A. (2007): Az ondó biológiai és mikrobiológiai vizsgálata. In: Házi emlősállatok mesterséges termékenyítése. Szerk Pécsi T., Mezőgazda Kiadó, Budapest. 104-105.
184. Pécsi, T. (2007): Házi emlősállatok mesterséges termékenyítése. Mezőgazda Kiadó. Budapest. 412.
185. Pérez-Pé, R., Grasa, P., Fernández-Juan, M., Peleato, M.L, Cebrián-Pérez, J.A, Muiño-Blanco, T. (2002): Seminal plasma proteins reduce protein tyrosine phosphorylation in the plasma membrane of cold-shocked ram spermatozoa. *Molecular Reproduction and Development*. 61. 226–233.
186. Pommer, A.C., Rutllant, J., Meyers, S.A. (2003): Phosphorylation of protein tyrosine residues in fresh and cryopreserved stallion spermatozoa under capacitating conditions. *Biology of Reproduction*. 68. 1208–1214.
187. Póti, P., Bedő, S., Mézes, M., Tőzsér, J. (1999): Tenyészkos-jelöltek termékenyítő képességének értékelése, 1. közlemény. *Állattenyésztés és Takarmányozás*. 47. 221-230.
188. Petrunkina, A.M., Waberski, D., Bollwein, H., Sieme, H. (2010): Identifying non-sperm particles during flow cytometric physiological assessment: a simple approach. *Theriogenology*. 73. 995-1000.
189. Reddy, N.S., Mohanarao, G.J., Atreja, S.K. (2010): Effects of adding taurine and trehalose to tris-based egg yolk extender on buffalo (*Bubalus bubalis*) sperm quality following cryopreservation. *Animal Reproduction Science*. 119. 183-190.
190. Rodrigues, P., Eckersall, D., De Almmeida, A. (2012): Farm Animal Proteomics: Proceedings of the 3rd Managing Committee Meeting and 2nd Meeting of Working Groups 1, 2 & 3 of COST Action FA1002. Wageningen Academy Publishing. 208.

191. Ruby, A.J., Kuttan, G., Dinesh, B., Rajasekharan, K.N., Kuttan, R. (1995): Antitumor and antioxidant activity of natural curcuminoids. *Cancer Letters*. 94. 79-83.
192. Rust, C., Gores, G.J. (2000): Apoptosis and liver disease. *American Journal of Medicine*. 108. 567-574.
193. Ruwanpura, S.M., McLachlan, R.I., Meachem, S. (2010): Hormonal regulation of male germ cell development. *Journal of Endocrinology*. 205. 117-131.
194. Saacke, R.G. (2008): Sperm morphology: Its relevance to compensable and uncompensable traits in semen. *Theriogenology*. 70. 473-478.
195. Said, T., Paasch, U., Glander, H.J., Argawal, A. (2004): Role of caspase in male fertility. *Human Reproduction Update*. 10. 39-51.
196. Sakkas, D., Urner, F., Bizzaro, D. (1998): Sperm nuclear DNA damage and altered chromatin structure: effect on fertilization and embryo development. *Human Reproduction*. 13. 11-19.
197. Salamon, S., Maxwell, W.M.C. (1995): Review. Frozen storage of ram semen. I. Processing, freezing, thawing and fertility after cervical insemination. *Animal Reproduction Science*. 37. 185-249.
198. Salamon, S., Maxwell, W.M.C. (2000): Storage of ram semen. *Animal Reproduction Science*. 62. 77-111.
199. Sanocka, D., Kurpisz, M. (2004): Reactive oxygen species and sperm cells. *Reproductive Biology and Endocrinology*. 2. 12-26.
200. Sariözkan, S., Bucak, M.N., Tuncer, P.B., Ulutaş, P.A., Bilgen, A. (2009): The influence of cysteine and taurine on microscopic-oxidative stress parameters and fertilizing ability of bull semen following cryopreservation. *Cryobiology*. 58. 134-138.
201. Sarlós, P. (1996): Kosspermatérmelés, kosspermaminőség In.: Juhtartás és Szaporítástechnológia. ÁTK Kiadvány, Herceghalom. <http://www.atk.hu/Magyar/Ubbs/juhtart/index.html> (2010.12.12.)
202. Sarlós, P. (1999): A sertés ivari működése, ÁTK Kiadvány, Herceghalom. <http://miau.gau.hu/osiris/content/docs/atk/serttech04.html> (2010.12.12.)
203. Sarlós, P., Egerszegi, I., Balogh, O., Molnár, A., Cseh, S., Rátky, J. (2013): Seasonal changes of scrotal circumference, blood plasma testosterone concentration and semen characteristics in Racka rams. *Small Ruminant Research*. 111. 90-95.

- 204.Sarlós, P., Molnár, A. (1995): Seasonal changes in sperm parameters of British Milk sheep rams. *Acta Veterinaria Hungarica* 43. 247-257.
- 205.Sarlós, P., Molnár, A., Huszár, Sz., Rátky, J., Brüssow, K.P. (1996): Seasonal changes of andrological characteristics in British milk ram. *Archiv Tierzucht*. 39. 265-275.
- 206.Sarlós, P., Molnár, A., Kókai, Gy., Gábor, Gy., Rátky, J. (2002): Comparative evaluation of the effect of antioxidants in the conservation of ram semen. *Acta Veterinaria Hungarica*. 50. 235-245.
- 207.Sies, H. (1997): Oxidative stress: Antioxidants and oxidants. *Experimental Physiology*. 82. 291-295.
- 208.Sikka, S.C. (1991): Relative impact of oxidative stress on male reproductive function. *Current Medicinal Chemistry*. 8. 851–862.
- 209.Sikka, S.C., Rajasekaran, M., Hellstrom, W.J.G. (1995): Role of oxidative stress and antioxidants in male infertility. *Journal of Andrology*. 16. 464–468.
- 210.Shapiro, H.M. (2003): Practical flow cytometry. John Wiley & Sons Inc. 4th Edition. 736.
- 211.Sharpe, J.C., Evans, K.M. (2009): Advances in flow cytometry for sperm sexing. *Theriogenology*. 71. 4-10.
- 212.Shi, L.G., Yang, R.J., Yue, W.B., Xun, W.J., Zhang, C.X., Ren, Y.S., Shi, L., Lei, F.L. (2010): Effect of elemental nano-selenium on semen quality, glutathione peroxidase activity, and testis ultrastructure in male Boer goats. *Animal Reproduction Science*. 118. 248-254.
- 213.Soleimanzadeh, A., Saberivand, A. (2013): Effect of curcumin on rat sperm morphology after the freeze-thawing process. *Veterinary Research Forum*. 4. 185-189.
- 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. 149-162.
- 215.Souza, C.E.A., Rego, J.P.A., Lobo, C.H., Oliveira, J.T.A., Nogueira, F.C.S., Domont, G.B., Fioramonte, M., Gozzo, F.C., Moreno, F.B., Monteiro-Moreira, A.C.O., Figueiredo, J.R., Moura, A.A. (2012): Proteomic analysis of the reproductive tract fluids from tropically-adapted Santa Ines rams. *Journal of Proteomics*. 20. 1-21.

- 216.Sylvester, C., Morales, R., Oko, R., Griswold, M.D. (1991): Localization of sulfated glycoprotein-2 (clusterin) on spermatozoa and in the reproductive tract of the male rat. *Biology of Reproduction*. 45. 195-207.
- 217.Szabó, Z., Szeleine Szomor, J., Földi, I., Janaky, T. (2012): Mass spectrometry-based label free quantification of gel separated proteins. *Journal of Proteomics*. 75. 5544-5553.
- 218.Szász, F. (2007): Az ondó vizsgálata. In: Házi emlősállatok mesterséges termékenyítése. Szerk.: Pécsi T. Mezőgazda Kiadó, Budapest. 95-103.
- 219.Szele, T. (2006): Gazdaságos nyúlhús termelés. In.: Versenyképes állattenyésztés. Szerk.: VARGA CS., Nyíregyháza. 128.
- 220.Szenci, O. (1984): Mesterséges termékenyítés. In.: A háziállatok szaporodása és mesterséges termékenyítése. Mezőgazda Kiadó, Budapest. 205.
- 221.Tasseron, F., Amir, D., Schindler, H. (1977): Acrosome damage of ram spermatozoa during dilution, cooling and freezing. *Journal of Reproductive Fertility*. 51. 461-462.
- 222.Tardif, S., Dube, C., Cevalier, S., Bailey, J.L. (2001): Capacitation is associated with tyrosine phosphorylation and tyrosine kinase-like activity of pig sperm proteins. *Biology of Reproduction*. 65. 784–792.
- 223.Tardif, S., Dube, C., Bailey, J.L. (2003): Porcine sperm capacitation and tyrosine kinase activity are dependent on bicarbonate and calcium but protein tyrosine phosphorylation is only associated with calcium. *Biology of Reproduction*. 68. 207–213.
- 224.Tervit, H.R., Whittingham, D.G. (1972): Successful culture in vitro of sheep and cattle ova. *Journal of Reproductive Fertility*. 30. 493-497.
- 225.Tesarik, J., Mendoza, C. (1993): Insights into the function of sperm surface progesterone receptor: Evidence of ligand induced receptor aggregation and implication of proteolysis. *Experimental Cell Research*. 205. 11-117.
- 226.Thérien, I., Moreau, R., Manjunath, P. (1998): Major proteins of bovine seminal plasma and high-density lipoprotein induce cholesterol efflux from epididymal sperm. *Biology and Reproduction*. 59. 768–76.
- 227.Torre, M.L., Faustini, M., Attilio, K.M.E., Vigo, D. (2007): Cell Encapsulation in Mammal Reproduction, *Recent Patents on Drug Delivery & Formulation* 1. 81-85.

228. Tsuji, T., Okada, H., Fujisawa, M., Hamaguchi, Y., Kamidono, S. (2002): Automated sperm concentration analysis with a new flow cytometry-based device. *American Journal of Clinical Pathology*. 117. 401-408.
229. Underwood, E.J., Suttle, N.F. (1999): *The Mineral Nutrition of Livestock*, 3rd edition. CABI Publishing. 614.
230. Uysal, O., Bucak, M.N. (2007): Effects of oxidized glutathione, bovine serum albumin, cysteine and lycopene on the quality of frozen-thawed ram semen. *Acta Veterinaria Brno*. 76. 383-390.
231. Vadnais, M. L., Kirkwood, R.N., Tempelman, R.J., Sprecher, D.J., Chou, K. (2005): Effect of cooling and seminal plasma on the capacitation status of fresh boar sperm determined using chlorotetracycline assay. *Animal Reproduction Science*. 87. 121-132.
232. Vahid, Y., Kóbori, J. (2002): *A merinó juhok tenyésztése és kiválasztása*. Szaktudás Kiadó Ház Rt. Budapest. 200.
233. Vass, N., Cseh, S., Jávör, A. (2008): Asszisztált reprodukciós technikák (ART) a juhtenyésztésben. In: *A juhtenyésztés jelene és jövője az EU-ban*. Szerk.: Kukovics, S., Jávör, A., Herceghalom-Debrecen, 361-375.
234. Veress, L. (1982): *Juhtenyésztők kézikönyve*, Mezőgazdasági Kiadó, Budapest. 537.
235. Vermes, I., Haanen, C., Reutelingsperger, C. (2000): Flow cytometry of apoptotic cell death. *Journal of Immunological Methods*. 243. 167-190.
236. Vinod, B.S., Antony, J., Nair, H.H., Puliappadamba, V.T., Saikia, M., Narayanan, S.S., Anto, R.J. (2013): Mechanistic evaluation of the signaling events regulating curcumin-mediated chemosensitization of breast cancer cells to 5-fluorouracil. *Cell Death and Disease*. 4. 508-512.
237. Visser, S., Salamon, S. (1974): Fertility following inseminations with frozen-thawed reconstituted and unconcentrated ram semen. *Journal of Biological Science*. 27. 423-425.
238. Vredenburg-Wilberg, W.L., Parrish, J.J. (1995): Intracellular pH of bovine sperm increases during capacitation. *Molecular Reproduction and Development*. 40. 490.
239. Wassarman, P.M. (1999): Mammalian fertilization: molecular aspects of gamete adhesion, exocytosis, and fusion. *Cell*. 96. 175-183.

240. Wani, N., Wani, G., Khan, M., Salahudin., S. (2000): Effect of oocyte harvesting techniques on in vitro maturation and in vitro fertilization in sheep. *Small Ruminant Research*. 36. 63-67.
241. Watson, P.F. (1995): Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thaw function. *Reproduction, Fertility and Development*. 7. 871-891
242. Woessner, J.P. (1994): The family of matrix metalloproteinases. *Annual New York Academy Science*. 732. 11-21.
243. Wolfsberg, T.G., Straight, P.D., Gerena, R.L., Huovila, A.P., Primakoff, P., Myles, D.G. (1995): ADAM, a widely distributed and developmentally regulated gene family encoding membrane proteins with a disintegrin and metalloprotease domain. *Developmental Biology*. 169. 378-383.
244. Wyllie, A.H., Kerr, J.F., Currie, A.R. (1980): Cell death: the significance of apoptosis. *International Review and Cytology*. 68. 251-306.
245. Yanagimachi, R. (1994a): Fertility of mammalian spermatozoa its development and relativity. *Zygote*. 3. 371-372.
246. Yanagimachi, R. (1994b): Mammalian fertilization. In: *Physiology of Reproduction*. Eds: Knobil E., Neill J. Raven Press, New York. 189-317.
247. Yániz, J., Martí, J.I., Silvestre, M.A., Folch, J., Santolaria, P., Alabart, J.L., López-Gatius, F. (2005): Effects of solid storage of sheep spermatozoa at 15 degrees C on their survival and penetrating capacity. *Theriogenology*. 64. 1844-1951.
248. Zhao, B., Li, X., Ho, R, Cheng, S, Xin, W. (1989): Scavenging effect of extracts of green tea and natural antioxidants on active oxygen radicals. *Cell Biophysics*. 14. 175-185.
249. INTERNET1: <http://medicine.utah.edu>

11 PUBLIKÁCIÓK AZ ÉRTEKEZÉS TÉMAKÖRÉBEN

Több szerzős könyv

Oláh J. – Budai Cs. – Magyar K. – Kovács A. – Vass N. – Kusza Sz. – Jávora A. (2010): Awassi és szapora merinó kosok ondójának vizsgálata újhold és telehold idején. In: Kukovics Sándor – Jávora András: A fejlesztés lehetőségei a juhágazatban. JUHINNOV Platform, Budapest, 269-276. ISBN 978-963-08-0624-4.

Tudományos közlemény idegen nyelvű, lektorált folyóiratban:

Budai Cs. - Egerszegi I. - Olah J. – Javor A. – Kovacs A. (2014): The protective effect of antioxidants on liquid and frozen stored ram semen. Scientific Papers: Animal Science and Biotechnologies, 2014, 47 (1) 46-52.

Budai Cs. - Gavojdian D.- Kusza Sz. - Csiszter L.T. – Olah J. - Padeanu I. - Kovacs A. - Javor A. (2013): Comparative Study regarding Reproductive Performance in Gyimesi racka and Turcana Sheep Breeds. Scientific Papers: Animal Science and Biotechnologies, 2013, 46 (2) 351-356.

Csizmar N. - Győri Zs. - Budai Cs. - Oláh J. - Kovács A. - Jávora A. (2013): Influence of Birth type and Sex on the Growth performance of Dorper lambs. Scientific Papers: Animal Sciences and Biotechnologies, 2013, 46 (2) 347-350.

Budai Cs.- Gavojdian D.- Kovacs A. – Negrut F. – Oláh J.– Csiszter L.T. – Kusza Sz.– Jávora A. (2013): Performance and Adaptability of the Dorper Sheep Breed under Hungarian and Romanian Rearing Conditions. Animal Science and Biotechnologies 46 (1) 344-349.

Oláh J. - Kusza Sz. – Harangi S. - Posta J. – Kovacs A. – Budai Cs.– Pécsi A. – Jávora A. (2012): Seasonal changes in scrotal circumference and the quantity and quality of ram semen in Hungary. Archiv Tierzucht 56 (10) 1-7. ISSN: 0003-9438 (IF: 0.416)

Tudományos közlemények magyar nyelvű, lektorált folyóiratban:

Budai Cs, Egerszegi I., Oláh J., Jávora A., Kovács A. (2014): Application of novel semen evaluation techniques. Acta Agraria Debreceniensis (megjelenés alatt).

Budai Cs. - Oláh J. - Egerszegi I. - Kovács A.- Jávora A. (2013): Seasonal variation in some reproductive parameters of Dorper rams in Hungary, Acta Agraria Debreceniensis 53. 17-20.

Budai Cs. – Egerszegi I. - Rátky J. - Kovács A. (2012): A kossperma eltarthatósága zselatinos hígítóban. Agrártudományi Közlemények. Acta Agraria Debreceniensis 48. 7-10.

Ismeretterjesztő publikációk:

Budai Cs. – Gavojdian D. – Padeanu I. – Csiszter L.T (2013): A romániai juhtenyésztés helyzete. Magyar Juhászat és Kecsketenyésztés: A Magyar Mezőgazdaság melléklete. 22. 4-6.

Budai Cs. - Pérez-Pé R. - Muiño-Blanco T.– Cebrián-Pérez J. (2013): Juhtenyésztéssel összefüggő kutatások Zaragozában. Magyar Juhászat és Kecsketenyésztés: A Magyar Mezőgazdaság melléklete. 22. 6-8 p.

Budai Cs. – Bihari R. – Németh T. – Kovács A. (2012): Ne párosíts szarvatlan kecskét szarvatlannal! Magyar Juhászat és Kecsketenyésztés: A Magyar Mezőgazdaság melléklete 21. 6-8. p.

Kovács A. – Budai Cs. (2011): Beszámoló a nemzetközi Nolana konferenciáról. Magyar Juhászat és Kecsketenyésztés: A Magyar Mezőgazdaság melléklete 20. 6-8.

Konferenciák:

Magyar nyelvű absztrakt

Budai Cs. - Knop R. - Desalegn A. - Oláh J. - Egerszegi I.- Sarlós P. - Rátky J. - Kovács A. (2011): Élő/elhalt és akroszóma festés jobb differenciálása sárga lefedő segítségével. 17. Szaporodásbiológiai Találkozó, Herceghalom, 2011. október 27.-28.

Idegen nyelvű absztrakt

Budai Cs. (2014): The protective effect of antioxidants on liquid and frozen stored ram semen. Banat's University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine „King Michael I of Romania” from Timisoara Scientific Conferences, Timisorara, Edition 2, 205.

Budai Cs. – Gavojdian D. – Ciszter L.T. (2013): Effects of genotype by environment interactions on pre-weaning survival rates of lambs. Joined East and West Central Europe ISAE Original Meeting. 2013. október 9-10. Szkopje, Macedónia.

Magyar nyelvű nem lektorált konferencia kiadvány:

Budai Cs. – Oláh J. – Kovács A. (2013): Fehér dorper kosok spermatológiai jellemzői különböző évszakokban. XIX. Ifjúsági Tudományos Fórum, 2013. április 25. Keszthely

Idegennyelvű, lektorált konferencia kiadvány:

Budai Cs. – Pérez-Pé R. – Casao A. – Cebrián-Pérez J. – Muiño Blanco T. – Jávora A. – Kovács A. (2014): Effect on membrane integrity of sodium-alginate, in different dilution rates of cooled ram semen. 20th Youth Scientific Forum, 23-24 May 2014, Keszthely, 311-323. ISBN: 978-963-9639-57-7

Noya A. – Budai C.- Casao A. – Cebrián-Pérez, J.A. – Muiño-Blanco, T. – Pérez-Pé, R. (2014): Effect of seminal plasma proteins on refrigerated ram sperm quality and fertility. Congreso AERA (Asociación Española de Reproducción Animal) 2014. 2014. október 16-18. (elfogadva)

A kutatási témához közvetlenül nem kapcsolódó publikációk:

Csizmár N. – Budai Cs. – Kovács A. – Posta J. – Gavojdian D. – Jávora A. – Oláh J. (2014): Influence of birth type, sex and genotype on the growth performance of purebred Dorper lambs. Animal Science and Biotechnologies 46 (2) 347-350.

Gudaj R. – Budai Cs. – Brydl E. – Komlósi I. (2012): A sántaság alakulása hazai tehenészetekben III. –Sikerek a sántaság megelőzésében és csökkentésében- Holstein Magazin. 6. 40-42.

Magyar nyelvű poszter

Budai Cs. – Gavojdian D. – Oláh J. – Kusza Sz. – Ciszter L.T. – Padeanu I. – Dunka B. – Kovács A.- Jávora A. (2013): Gyimesi racka and Turcana sheep. 76. Országos Mezőgazdasági és Élelmiszeripari Kiállítás és Vásár, Budapest, 2013. szeptember 18-22.

Idegen nyelvű poszter:

Bordán J. – Budai Cs. – Oláh J. – Kovács A. (2014): Male pseudohermaphroditism in polled goats: a review. ERCG Conference. 2014. április 08-11. Debrecen

12 ÁBRÁK JEGYZÉKE

1. ábra: Az ondósejt szerkezete.....	11
2. ábra: A hidegsokk hatása a spermiumokra.....	13
3. ábra: A kapacitáció folyamata.....	18
4. ábra: Az akroszómareakció folyamata.....	20
5. ábra: A penetráció folyamata.....	21
6. ábra: Az apoptózis intrinsic és extrinsic útvonala.....	22
7. ábra: Hematoxilin-eozinnal festett spermiumok.....	23
8. ábra: Az oxidatív stressz hatása a spermasejtekre.....	24
9. ábra: Az 1/A kísérlet elrendezése.....	41
10. ábra: Élő/elhalt akroszmafestéssel jelölt spermiumok.....	44
11. ábra: Kísérleti elrendezés 1/B kísérlet.....	45
12. ábra: Motilitásvizsgálat CASA rendszer segítségével.....	46
13. ábra: Harrison-Vickers-féle fluoreszcens festéssel jelölt spermiumok.....	47
14. ábra: CTC-festéssel jelölt spermiumok.....	49
15. ábra: Annexin-V festéssel jelölt spermiumok.....	51
16. ábra: A 2. számú kísérlet elrendezése.....	52
17. ábra: A 3. számú kísérlet elrendezése.....	57
18. ábra: A 4. számú kísérlet menete.....	58
19. ábra: A zona pellucidához kötődő spermiumok Hoechst 33342 fluoreszcens festét követően.....	66
20. ábra: A 1,5%-os zsírtartalmú UHT-tej+zselatin tartalmú hígítókban az élő, ép sejtek %-os aránya az ötnapos tárolás során, +5°C-on.....	70
21. ábra: A 1,5%-os zsírtartalmú UHT-tej+5% tojássárgája+zselatin tartalmú hígítókban az élő, ép sejtek %-os aránya az ötnapos tárolás során.....	71
22. ábra: 2D-PAGE gélkép és az azonosított ondóplazma fehérjék.....	82
23. ábra: A kapacitációs státusz vizsgálati eredménye.....	95
24. ábra: Az apoptózis vizsgálat eredménye +15°C-ra hűtött kosspermánál.....	96
25. ábra: A foszfatidilszerin transzlokáció mértéke a +15°C-ra hűtött termékenyítőanyagban.....	97
26. ábra: A Tunel-tesz eredménye a +15°C-ra hűtött kosspermánál.....	98

27. ábra: A petesejthez kötődő spermiumok száa a különböző típusú +15°C-ra hűtött, hígított sperma esetén.....99

13 TÁBLÁZATOK JEGYZÉKE

1. **táblázat:** Vizsgálatok helyszínei, a kísérleti állatok és a kísérletek időpontja.....39
2. **táblázat:** A motilitás értékelő rendszere.....42
3. **táblázat:** A különböző nátrium- alginát koncentráció hatása a kossperma vizsgált jellemzőire, +15°C-ra hűtést követően.....72
4. **táblázat:** A nátrium-alginát tartalmú hígítóban tárolt sperma motilitás változása 48h-ás tárolás során.....73
5. **táblázat:** A +5°C-on tárolt kossperma membránintegritása.....74
6. **táblázat:** A kapacitációs státusz vizsgálata a 48h-át tárolt ondónál.....75
7. **táblázat:** A foszfatidilszerin transzlokáció vizsgálata a 48h-án át tárolt spermánál.....76
8. **táblázat:** Fehér dorper kosok spermaminőségének alakulása szelénes takarmány- kiegészítés hatására.....77
9. **táblázat:** A vér szeléntartalma (ppb) a kísérlet különböző időpontjaiban.....78
10. **táblázat:** A kontroll és szelénos csoport között expressziós különbséget mutató fehérjék.....80
11. **táblázat:** Dorper kosok spermatermelése és herekörmérete évszakonként.....83
12. **táblázat:** Fehér dorper kosok spermatermelése, here körmérete évszakonként...84
13. **táblázat:** Membránintegritás és mitokondriális aktivitás vizsgálata a +5°C-ra hűtött spermánál.....87
14. **táblázat:** Kapacitációs státusz vizsgálata CTC-módszerrel.....88
15. **táblázat:** A foszfatidilszerin transzlokáció vizsgálat eredményei.....89
16. **táblázat:** A Casp-3,-7 aktivitás eredménye +5°C-ra hűtött sperma esetén.....90
17. **táblázat:** A Tunel- teszt eredménye a 48h-ás eltartási próba során.....91
18. **táblázat:** Az in vitro fertilizáció eredményei a sperma 24h-ás tárolását követően.....92
19. **táblázat:** A kurkumin és ondóplazma kiegészítés hatása a +15oC-on tárolt kossperma motilitására, membránintegritására és mitokondriális aktivitására.....94

14 RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

ANP	Atriális nátriuretikus hormon
APAF-1	Apoptotic Protease Activating Factor-1
ATP	Adenozin trifoszfát
BSA	Bovine Serum Albumin
BSP	Bovine Seminal Plasma protein
cAMP	Ciklikus adenozin-monofoszfát
CFDA	Karboxi-fluoreszcein diacetát
CHAPS	[3-(3-(cholamydopropyl) dimethyl-ammonio)-1 propane sulphonate]
CTC	Klórtetraciklin
DMSO	Dimethyl sulfoxide
DNS	Dezoxi ribonukleinsav
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Etilén-diamin-tetraecetsav
EGF	Epidermális növekedési faktor
ETDH ₁	Etidium-homodimer
HEPES	4-(2-hidroxietyl)-1-piperazin-etánszulfonsav
IAP	Inhibitor of Apoptosis Proteins
LH	Luteinizáló hormon
MS	Medium swim-up
P	Progeszteron
PAF	Vérlemezke aktiváló faktor
PGDS	Prosztaglandin D2 szintetáz
PGE ₁	Prosztaglandin E ₁
PBS	Phosphate buffered saline
PI	Propídium-jodid
ppb	Parts per billion
ppm	Parts per million
PS	Foszfatidil szerin
RONS	Reactive Oxygen and Nitrogen Species
ROS	Reactive Oxygen Species
SMAC	Second Mitochondria-Derived Activator Caspases

TUNEL	Terminal deoxynucleotide transferase-mediated deoxyuridine triphosphate nick end-labeling
ZP3	Zona pellucida sperm-binding protein 3

MELLÉKLETEK

1. melléklet: A +15°C-ra hűtött sperma vizsgált jellemzői

Vizsgált jellemzők	Swim-up után					
	Frissen	Hűtés után				
		Swim-up médium (kontrol)	+25mg/ml ondóplazma protein	+tej	+1,0nM kurkumin	+2,0nM kurkumin
(%)	X±SEM	X±SEM	X±SEM	X±SEM	X±SEM	X±SEM
NCL	30,25±14,17	13,00±9,59 ^a	51,66±5,13 ^b	32,25±14,45	37,00±10,58	32,00±7,93
NCD	23,25±20,18 ^{NS}	30,75±23,57 ^{NS}	6,02±2,64 ^{NS}	5,25±1,25 ^{NS}	4,75±1,70 ^{NS}	6,34±4,04 ^{NS}
C	32,75±19,36 ^{NS}	40,75±23,17 ^{NS}	34,66±11,37 ^{NS}	46,50±14,15 ^{NS}	43,75±11,87 ^{NS}	49,00±10,44 ^{NS}
R	13,75±12,97 ^{NS}	15,50±9,57 ^{NS}	7,66±8,08 ^{NS}	16,00±13,58 ^{NS}	14,50±14,54 ^{NS}	12,66±6,65 ^{NS}
Anx-/PI-	38,15±19,09 ^a	15,47±3,15 ^b	65,16±11,96 ^{b,c}	23,95±4,79	21,77±3,18	19,80±3,83
Anx-/IP+	21,98±6,08 ^{NS}	21,12±5,23 ^{NS}	8,96±4,76 ^{NS}	26,07±4,49 ^{NS}	23,35±18,16 ^{NS}	22,50±7,35 ^{NS}
Anx+/IP+	35,02±17,84 ^{NS}	52,37±17,00 ^{NS}	9,10±7,83 ^{NS}	39,10±13,65 ^{NS}	42,05±17,13 ^{NS}	50,56±1,17 ^{NS}
Anx+/IP-	4,85±1,17 ^{NS}	11,04±6,42 ^{NS}	16,87±2,16 ^{NS}	10,88±4,41 ^{NS}	12,83±7,24 ^{NS}	7,14±1,81 ^{NS}
Casp-/Eth-	31,27±14,21 ^{NS}	30,55±20,86 ^{NS}	52,33±14,45 ^{NS}	39,55±12,07 ^{NS}	41,87±17,16 ^{NS}	41,70±13,46 ^{NS}
Casp-/Eth+	24,13±12,97 ^{NS}	28,50±17,87 ^{NS}	10,26±11,37 ^{NS}	24,80±17,25 ^{NS}	19,55±11,53 ^{NS}	18,36±13,73 ^{NS}
Casp+/Eth-	5,15±2,92 ^{NS}	5,45±3,39 ^{NS}	5,66±1,30 ^{NS}	4,97±3,29 ^{NS}	5,00±2,80 ^{NS}	5,26±3,02 ^{NS}
Casp+/Eth+	39,45±7,19 ^{NS}	35,50±13,44 ^{NS}	31,83±3,10 ^{NS}	30,97±4,39 ^{NS}	33,67±3,49 ^{NS}	35,03±5,12 ^{NS}
Tunel-	74,40±2,83 ^{NS}	69,87±4,59 ^{NS}	68,80±12,34 ^{NS}	56,77±13,36 ^{NS}	61,42±13,83 ^{NS}	57,50±13,08 ^{NS}
Tunel+	25,60±2,83 ^{NS}	30,15±4,56 ^{NS}	31,20±12,34 ^{NS}	43,22±13,36 ^{NS}	38,57±13,83 ^{NS}	42,50±13,08 ^{NS}

NS-nem szignifikáns

^{a, b, c} - a különböző betűvel jelölt átlagok szignifikáns (P<0,05) különbségeket mutatnak azonos vizsgált jellemzők esetében

15 KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Szeretnék köszönetet mondani témavezetőimnek, **Dr. Kovács Andrásnak** és **Dr. Rátky Józsefnek** a hasznos és iránymutató tanácsokért és a szakmai támogatásért, melyek alapvető mértékben hozzájárultak a dolgozat és a tudományos közlemények megszületéséhez. Köszönöm **Dr. Jávor András** professzornak, hogy támogatta a Spanyolországban és Romániában végzett kutatómunkáimat, melyek nagymértékben hozzájárultak a dolgozat elkészüléséhez és segítették a szakmai előremenetelemet.

Jó érzéssel gondolok vissza arra, hogy a témám alapjait **Dr. Pécsi Tamástól**, **Dr. Oláh Jánostól**, **Dr. Egerszegi Istvántól** tanulhattam meg. Hálásan köszönöm mindannyiuk szakmai tanácsait, türelmét és segítő szándékát és az elmélyült beszélgetéseket, melyek nagymértékben segítették a témám megértését.

Külön köszönöm a Zaragozai Állatorvosi Egyetem BIOZAR Intézet vezetőinek **Prof. José-Cebrián-Péreznek**, **Prof. Teresa Muño-Blanconak**, **Dr. Rosaura Pérez-Pének**, hogy kutatásaimat az irányításukkal végezhettem és mindvégig segítették a munkámat és támogattak. Köszönöm a BIOZAR Intézet minden tagjának a hasznos tanácsait. Hálás vagyok **Dr. Adriana Casaonak** és **Agustí Noyának** a közösen elvégzett munkáért és a laborvizsgálatok elvégzéséhez nyújtott segítségükért.

Köszönöm **Dr. Prokisch Józsefnek**, **Dr. Sztrik Attilának**, hogy biztosították a takarmányozási kísérlethez szükséges nanoszelént illetve, hogy a vérminták vizsgálatához szükséges infrastruktúrális háttérrel rendelkezésemre bocsátották. Köszönöm **Dr. Szöllősi Jánosnak** és **Szalóki Gábornak** a flow citometriás vizsgálatokhoz nyújtott segítséget.

Köszönet **Gulyás Gabriellának** és **Dr. Czeglédi Leventének** a proteomikai vizsgálatokhoz nyújtott segítségükért, **Dr. Posta Jánosnak** a szakmai tanácsokért.

Köszönöm továbbá **Dr. Knop Renátának**, **Dr. Kusza Szilviának**, **Dr. Dinu Gavojdiannak** a támogatásukat, mellyel a munkámat segítették.

Külön köszönettel tartozom a Kismacsi Kísérleti Telep volt és jelenlegi munkatársainak, **Sass Imrének**, **Tózsérné Hosszú Erikának**, **Kiss Lajosnak**, **Elek Sándornak**, **Nagy Imrének**, **Sass Erikának** a segítséget, amit a kísérleteim elvégzéséhez nyújtottak. Továbbá **Török István**, **Sóvágó Judit**, **Győri Zsolt**, **Csizmár Nikolett** MSc hallgatóknak szeretném megköszönni a munkámhoz nyújtott segítségüket.

Őszinte hálával, köszönettel és tisztelettel tartozom **Szüleimnek, Családomnak, Barátaimnak** a szeretetükért, támogatásukért, tanácsaikért és nem utolsó sorban a belém vetett hitükért, mely nélkül jelen dolgozat nem készülhetett volna el.

A kutatásomat és a publikációk elkészítését a TÁMOP-4.2.2/B-10/1-2010-0024 azonosító számú projekt támogatta. A projekt az Európai Unió támogatásával, az Európai Szociális Alap társfinanszírozásával valósult meg.

A kutatás a TÁMOP 4.2.4.A/2-11-1-2012-0001 azonosító számú Nemzeti Kiválóság Program – Hazai hallgatói, illetve kutatói személyi támogatást biztosító rendszer kidolgozása és működtetése országos program Jedlik Ányos Doktorjelölti ösztöndíj című kiemelt projekt által nyújtott személyi támogatással valósult meg. A projekt az Európai Unió támogatásával, az Európai Szociális Alap társfinanszírozásával valósult meg.

A zárójelű munkám elvégzéséhez a Campus Hungary féléves részképzése keretében valósult meg.

16 NYILATKOZATOK

NYILATKOZAT

Ezen értekezést a Debreceni Egyetem Agrár- és Műszaki Tudományok Centruma, Mezőgazdaságtudományi Karán, az Állattenyésztési Tudományok Doktori Iskola keretein belül készítettem, a Debreceni Egyetem doktori (Ph.D.) fokozatának elnyerése céljából.

Debrecen, 2014.

.....
a jelölt aláírása

NYILATKOZAT

Tanusítom, hogy Budai Csilla doktorjelölt 2010-2013 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. május 20.

.....
a témavezető(k) aláírása