

Egyetemi doktori (PhD) értekezés tézisei

**ZSELATINOK, ANTIOXIDÁNSOK ÉS KÖRNYEZETI TÉNYEZŐK HATÁSA
KOSOK ANDROLÓGIAI PARAMÉTEREIRE**

Készítette:

BUDAI CSILLA
doktorjelölt

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



DEBRECENI EGYETEM
Állattenyésztési Tudományok Doktori Iskola

Debrecen, 2014

TARTALOMJEGYZÉK

TARTALOMJEGYZÉK.....	1
I. A DOKTORI ÉRTEKEZÉS ELŐZMÉNYEI ÉS CÉLKITŰZÉSEI	2
II. A KUTATÁS MÓDSZEREI.....	4
Kos sperma eltartása zselatinos hígítóban +5°C-on.....	5
Kos sperma eltartása zselatinos hígítóban +5°C és +15°C-on	5
Szelénes takarmány kiegészítés hatása a spermatermelésre, vér szelén-tartalmára és az ondóplazma fehérje-összetételére	6
Az évszak hatása a spermatermelésre és herekörméretére	6
A kurkumin és ondóplazma plazma kiegészítés hatása a kos spermára	7
III. AZ ÉRTEKEZÉS FŐBB MEGÁLLAPÍTÁSAI.....	11
Kos sperma eltartása zselatinos hígítóban +5°C-on kísérlet eredményei	11
Kos sperma eltartása zselatinos hígítóban +5°C és +15°C-on vizsgálat eredményei .	12
Szelénes takarmány kiegészítés hatása a spermatermelésre, vér szelén-tartalmára és az ondóplazma fehérje-összetételére kísérlet eredményei	14
Az évszak hatása a kosok spermatermelésre és here körméretére	17
A kurkumin és ondóplazma plazma kiegészítés hatása a kos spermára vizsgálat eredményei	18
IV. AZ ÉRTEKEZÉS ÚJ, ILLETVE ÚJSZERŰ MEGÁLLAPÍTÁSAI... Hiba! A	
könyvjelző nem létezik.	
V. AZ EREDMÉNYEK GYAKORLATI HASZNOSÍTHATÓSÁGA.....	22
VI. PUBLIKÁCIÓK AZ ÉRTEKEZÉS TÉMAKÖRÉBEN.....	23

I. A DOKTORI ÉRTEKEZÉS ELŐZMÉNYEI ÉS CÉLKITŰZÉSEI

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, ugyanis ezzel a biotechnikai módszerrel viszonylag rövid idő alatt, gyors genetikai előrehaladás érhető el (PÉCSI, 2007). A módszer 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 kosok 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, 2007). A mesterséges termékenyítésnek 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 hazai juhtenyésztők körében rendkívül visszaesett a biotechnikai, biotechnológiai módszerek alkalmazása az utóbbi 30 év során, 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 a 2%-ot sem éri el (KUKOVICS és GERGÁTZ, 2009). Hazánkban kívánatos lenne a mesterséges termékenyítés fellendítése elsősorban azoknál a fajtáknál, amelyek szerepet játszanak a végtermék előállításában a keresztezésben. A hazai szarvasmarha ágazatban több évtizede bevett gyakorlat a bikák spermatermelésre, laboratóriumi minőségre, mélyhűthetőségre és fertilitásra történő generációk óta folytatott szelekciója, míg kosoknál ez a mai napig egy megvalósításra váró feladat. Ezért 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, ágazat versenyképességének fejlesztése és a génmegőrzés érdekében rendkívül

fontos lenne a termékenyítő anyag minőségi ellenőrzése, a spermakonzerválási eljárások javítása, továbbfejlesztése.

Célkitűzések

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 szódium-alginát akroszómavédő hatásának vizsgálata a sperma több napos hűtve tárolása során.
2. A második vizsgálat célja az elemi nano-szelén hatásának vizsgálata a spermaminőségre, a vér szeléntartalmára és az ondóplazma fehérje profiljára fehér dorper kosoknál.
3. A harmadik vizsgálat célja dorper kosok spermaminőségének és herekörméretének vizsgálata különböző évszakokban.
4. Az utolsó 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.

II. A KUTATÁS MÓDSZEREI

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 spermatermelésére, 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: Az elvégzett kísérletek és vizsgálatok

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)

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

A kísérletben 4 cigája kos ejakulátumát használtam fel. A mennyiség leolvasása után a spermiumok tömegmozgását határoztam meg OLYMPUS BX64 fáziskontraszt-mikroszkóp segítségével, 400x-os nagyítás mellett. Az értékeléshez SALAMON (1987) módszerét használtam. 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 sperma/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. A +5°C-ra hűtést követően az élő/elhalt sejtek számát és az akroszóma állapotát Kovács-Foote festéssel határoztam meg (KOVÁCS és FOOTE, 1992; NAGY és mtsai, 1999, KÚTVÖLGYI, 2006).

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

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. A membránintegritás vizsgálatát CFDA (karboxi-fluoreszcein diacetát) és PI (propídium-jodid) fluoreszcens festékekkel határoztam meg HARRISON és VICKERS (1990) módszere alapján. 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 kapacitáció állapotának meghatározását klórtetraciklin (CTC) fluoreszcens festéssel végeztem. A kapacitációs státusz értékelésére a GILLIAN és mtsai (1997) által leírt klórtetraciklin festést alkalmaztam, amit ETDH₁-festéssel kombináltam, hogy a

spermiumok életképessége is értékelhető legyen (GRASA és mtsai, 2006). 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.

A foszfatidilszerin transzlokáció vizsgálatát Annexin V-Cy3 Apoptosis Detection Kit segítségével határoztuk meg. A keneteket Nikon Eclipse E-400 mikroszkóp segítségével értékeltem 1000x nagyítással. Az élő sejteket (CFDA+) kék szűrő (B-2A: 450-490 nm), a foszfatidil szerin transzlokációt mutató sejteket (AnnV+) zöld szűrő (G-2A: 510-560 nm) segítségével értékeltem, majd kenetenként 200 sejt kategorizáltam.

Szelénes takarmány kiegészítés hatása a spermatermelésre, vér szelén-tartalmára és az ondóplazma fehérje-összetételére

A mennyiség leolvasása után a spermiumok motilitását OLYMPUS BX64 fáziskontraszt-mikroszkóp segítségével határoztam meg 400x-os nagyítás mellett. Az értékeléshez SALAMON (1987) módszerét használtam. Az ondó sűrűségét Minitube Photometer SDM5 fotometriás készülékkel értékeltem.

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. A membránintegritás vizsgálatát flow citométerrel végeztük.

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.

Az évszak hatása a spermatermelésre és herekörméretére

A harmadik kísérletet a Debreceni Egyetem Kismacsi Kísérleti Telepén végeztem. A vizsgálatokat hetente egy alkalommal végeztem el. Spermavételt követően meghatároztam az ondó mennyiségét, sűrűségét, tömegmozgását. A herekörméret mérésére a scrotum legszélesebb részén került sor, az erre a célra kialakított mérőszalag segítségével.

A kurkumin és ondóplazma plazma kiegészítés hatása a kos spermára

A Zaragozában végzett vizsgálatban rasa aragonesa kosok ondóját 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. A +15°C-on végzett kísérlet során a motilis, élő spermiumok szelektálására és a szeminális plazma eltávolítására az ALVAREZ és mtsai (1993) által kidolgozott, GARCÍA-LÓPEZ és mtsai (1996) által módosított dextranswim-up technikát alkalmaztam.

A spermiumok membránintegritásának és mitokondriális funkciójának vizsgálatához Mitotracker Deep Red-festéket használtam. A fluoreszcens festést követően 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 Mitotracker Deep Red emisszióját 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 kapacitáció állapotának meghatározását klórtetraciklin (CTC) fluoreszcens festéssel végeztem. A kapacitációs státusz értékelésére a GILLIAN és mtsai (1997) által leírt klórtetraciklin festést alkalmaztam, amit ETDH₁-festéssel kombináltam, hogy a spermiumok életképessége is értékelhető legyen (GRASA és mtsai, 2006). 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 (G-2A; 510-560 nm) szűrőt használtam. Lemezenként 200 spermiumot értékeltem.

Az foszfatidilszerin transzlokáció meghatározását Annexin V- FITC Apoptosis Detection Kit és flow citométer segítségével végeztem. A spermamintákat 300 μ L-re hígítottam, úgy hogy a sejtkoncentráció 4x10⁶ sejt/ml legyen. Az oldathoz 1 μ L Annexin-V festéket és 3 μ L PI pipettáztam, majd 15 percig, 37°C-on inkubáltam. Ezt követően 5 μ L formaldehiddel fixáltam a sejteket, majd flow citométerrel 20.000 spermiumot értékeltem és kategorizáltam

A Caspase-3 and -7 Detection Kit és flow citométer alkalmazásával határoztam meg a kaszpázok aktivitásának mértékét a mintákban. A spermamintát 300 μ L-re hígítottam (3×10^6 sperma/mL) PBS oldattal, 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 fordulat/perc 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 DNS fragmentáció mértékét Tunel-teszt (terminal transferase mediated dUDP nick end-labeling) segítségével határoztam meg. A spermamintát 500 μ L-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 100 μ L PBS-el. A mosások között az oldatot 8 percig 3200rpm/perc sebességgel centrifugáltam és a felülúszót eltávolítottam. Második centrifugálást követően a felülúszót 100 μ L permeabilizációs oldattal pótoltam. A mintát ezt követően 2 percig +4°C-on inkubáltam, majd ismét két mosást végeztem. A felülúszó eltávolítása után a pelletet 50 μ L labelin solutinnal 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/perc sebességgel centrifugáltuk 10 percen keresztül. A második mosást követően eltávolítottuk a felülúszót, amit 300 μ L PBS-el pótolunk, amihez 2 μ L Ethd-t adtunk. A spermát flow citométer segítségével értékeltük (20.000 sejt/minta).

A spermiumok fertilitásának meghatározásához ZBA, IVF módszert használtunk, illetve a +15°C-on tárolt mintákat mesterséges termékenyítésre használtuk fel.

A peteburok kötődési teszt a spermiumok funkcionális jellemzésére szolgáló módszer, melynek során a hímivarsejtek a petesejtet körülvevő burok (zona pellucida) ZP3 fehérjéihez kapcsolódnak. A kísérletben vágóhídról származó juh petesejteket használtunk, amelyeket fiziológiás sóoldatban, szobahőmérsékleten szállítottuk a laboratóriumba. A petesejteket WANI és mtsai (2000) módszerével a petefészek feldarabolása és hasogatása után gyűjtöttük be. A petesejteket felhasználásig 39°C-on tartottuk CO₂ (5%) termosztátban. A spermakonzentrációt 5×10^5 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 egy 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 IVF-hez használt petesejtek még ivarézés előtt álló rasa aragonesa jerkéktől gyűjtöttük be. Csak azok a petesejtek lettek felhasználva az in vitro maturáció során, 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, ami glükóz nélküli synthetic oviductal oldatot (TERVIT és WHITTINGHAM, 1972), 2% (v/v) oestrus sheep szérummal kiegészítve, 10µg/mL heparin, 1µg/mL hipotaurin. A fertilizáció napján a hűtött spermiumokat swim-up eljárás segítségével szelektáltuk és hozzáadtuk a petesejtekhez, melyek 350µL fertilizációs médiumban voltak, úgy hogy a spermiumok végső koncentrációja 1×10^6 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 a barázdálódás. A nem fejlődő petesejteket sztereomikroszkóp segítségével figyeltük meg, hogy hol állnak az érési folyamatban. Azok a petesejtek melyek zónájában sarki test volt, érettnak 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.

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) injekcióztunk be 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 a harmadik termékenyítés során egy anyajuhot nem termékenyítettünk. Ennek oka, hogy a vaginában nagy mennyiségű, fehér színű hüvelyváladék gyűlt fel, és a cervix 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.

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

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

A nátrium 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.

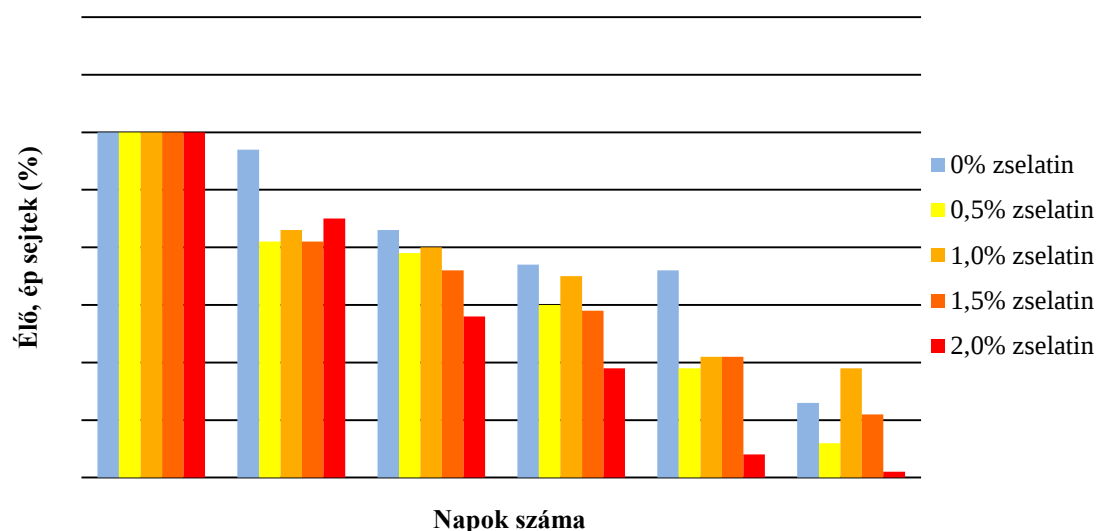
A negyedik kísérletben a hígítók és a tárolás idejének hatását GLM módszer segítségével határoztuk meg, míg a peteburok kötődési teszt és az in vitro fertilizáció során elért eredményeket egytényezős varianciaanalízis (one-way ANOVA)

segítségével. A varianciaanalízis során Tukey post hoc tesztet futtattunk le 5%-os szignifikancia szinten.

III. AZ ÉRTEKEZÉS FŐBB MEGÁLLAPÍTÁSAI

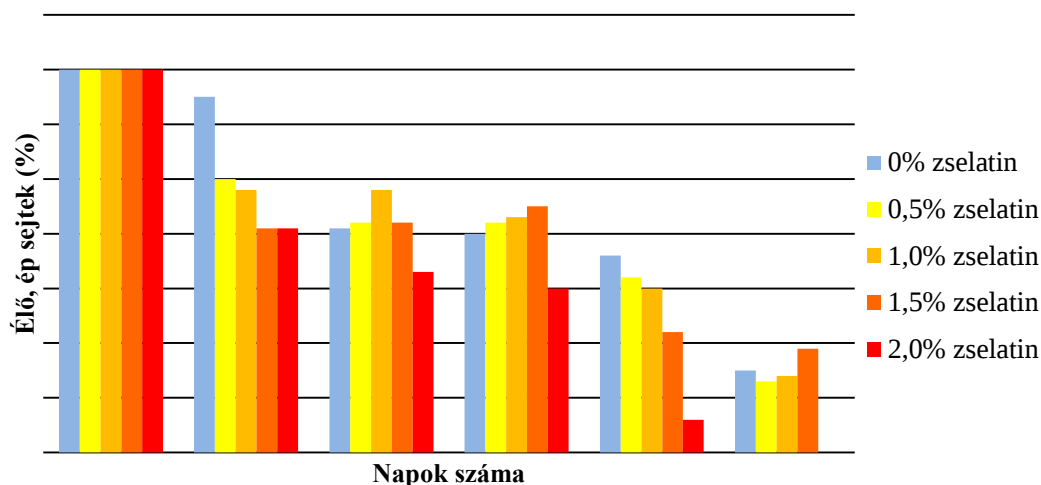
Kos sperma eltartása zselatinos hígítóban +5°C-on kísérlet eredményei

1/A kísérlet: Debrecenben végzett kísérlet



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

A vizsgálatok során megállapítottam, hogy a 1,5%-os zsírtartalmú UHT-tej + zselatin tartalmú hígítók közül az 1% zselatint tartalmazóban volt a legtöbb élő, ép spermium az ötödik napon (1. ábra). Az eredmények alapján arra a következtetésre jutottunk, hogy tejes hígítóban, öt napon át +5°C-on tárolt spermiumok az UHT tej+1,0% zselatin tartalmú hígítóban maradnak legtovább életben.



2. ábra: Az 1,5%-os zsírtartalmú UHT-tej+5% tojássárgája +zselatin tartalmú hígítókban az élő, ép sejtek %-os aránya az ötnapos tárolás során

A 1,5%-os zsírtartalmú UHT-tej+ 5% tojássárgáját is tartalmazó hígítók közül a 1,5% zselatint tartalmazóban volt a legmagasabb az élő, ép spermium aránya az ötödik napon (2. ábra). Az UHT tej+5% tojássárgája+2% zselatin tartalmú hígítóban az ötödik napon már nem találtunk élő, ép sejteket.

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

A különböző alginát koncentráció hatása a +15°C-ra hűtött spermánál

2. táblázat: Az alginát koncentrációjának hatása +15°C-ra hűtött kossperma vizsgált jellemzőire, 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)

*CFDA⁺/PI⁻ (membrán intakt sejtek), CFDA⁻/PI⁺ (elhalt sejtek), NCL (nem kapacitált élő sejtek), NCD (nem kapacitált, elhalt sejtek) CL (kapacitált, élő sejtek), CD (kapacitált, elhalt sejtek), R (reaktált sejtek), Anx⁻/CFDA⁺ (membrán intakt sejtek, foszfatidil szerin transzlokáció nélkül), Anx⁺/CFDA⁺ („apoptotikus” sejtek), Anx⁺/CFDA⁻ (elhalt sejtek)

Az alginát tartalmú hígítóban 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 (2. táblázat).

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

A spermiumok motilitása a szódium-alginát kiegészítés hatására folyamatosan csökkent az eltartási próba során. A legalacsonyabb motilitási értékeket a 1,5% és 2,0% szódium-alginát kiegészítés esetében tapasztaltuk. A szódium-alginát viszkózus anyag, mely jó vízmegkötő képességgel rendelkezik. A magas viszkozitás azonban negatívan befolyásolja a spermasejtek motilitását. A motilitás csökkenése eltartási próba során kedvező tulajdonság lehet. A spermasejtek mozgás közben felhasználják a szeminális plazmában vagy a hígítóban lévő glükózt, laktózt, amit ATP-vé alakítanak, hogy biztosítsák a mozgáshoz szükséges energiát. Az aktív folyamat lejárásakor során fokozódik a hígítóban a szabadgyökök koncentrációja, amely károsítja az ondósejtek membránszerkezetét, ezáltal csökkentve azok fertilizációs képességét. A zselatin csökkenti a sejtek mozgását, glükolízis mértékét, miáltal a hígítóban lévő cukrok hosszabb ideig biztosítják 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.

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. CORCINI 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.

Szelén takarmány kiegészítés hatása a spermatermelésére, vér szelén-tartalmára és az ondóplazma fehérje-összetételére kísérlet eredményei

3. táblázat: Fehér dorper kosok spermaminőségének alakulása

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	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	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 (x10⁹)	Se	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	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	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	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	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	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	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	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	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	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 takarmánykiegészítés hatására a 42. kezelési napon tapasztaltunk szignifikáns különbséget ($P < 0,05$) a szelén és a kontroll csoport sperma mennyiségében. A további napokon nem volt hatása a szelénnek a mennyiségre, de megállapítható, hogy a kísérlet végére mind két 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 sperma tömegmozgásában és progresszív motilitásában egyaránt a 63. és a 86. napon tapasztaltunk különbséget (3. táblázat). Mind a két időpontban a szelén csoport motilitás értékei voltak kedvezőbbek. 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.

4. 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)	154,66±31,24	168,10±132,09	120,06±52,88	161,25±62,78	171,87±31,32
Kontroll (ppb)	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 ($P > 0,05$) (4. táblázat).

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.

Az LC-MS módszer segítségével tíz fehérjét sikerült azonosítani, melyek expressziója eltérést mutatott a kontroll és kezelt csoport között. 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 spermatidák és spermiumok kanyarult 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, 2010). Az isocitrate dehydrogenase fehérje és a hím ivari működés közötti kapcsolatról jelenleg nem sok információ áll rendelkezésre. Holstein-fríz bikák esetében a gyenge ferilitású 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.

Az évszak hatása a kosok spermatermelésre és here körméretére

5. 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
menyiség (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
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

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 (5. táblázat).

6. 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
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 vizsgált jellemzők esetében

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 ($P < 0,05$) (6. táblázat).

A kurkumin és ondóplazma plazma kiegészítés hatása a kos spermára vizsgálat eredményei

A +5°C-on végzett, 48h-ás tárolás eredményei

A +5°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 1,0nM kurkumin és a +25 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.

A +15°C-ra hűtött spermával végzett kísérlet eredményei

Friss sperma esetében a progresszív motilitás 34,0% volt, ami hűtést követően a 20,0%-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 mitokondriális aktivitás egyik esetben sem mutatott eltérést a kontrollhoz viszonyítva.

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 hígítókban az élő, nem kapacitált sejtek száma a friss spermában kapott értékhez hasonló, attól nem különbözik szignifikáns mértékben ($P > 0,05$).

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.

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.

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 ($P>0,05$).

A vizsgálat során peteburok kötődési teszt segítségével határoztuk meg 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 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 termékenyítést követő 34. napon rektális ultrahangos

vizsgálatot végeztünk a vemhesség megállapítására. Az első termékenyítést követően mind két 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 ($P>0,01$).

IV. 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 szeminális 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.

V. AZ EREDMÉNYEK GYAKORLATI HASZNOSÍTHATÓSÁGA

1. A tej alapú hígítóval végzett cervikális termékenyítés továbbra is az egyik leghatékonyabb módja a +15°C vagy +5°C-ra hűtött kossperma felhasználásának
2. A nanoszelén oldat alkalmas tenyészkosok takarmány-kiegészítőként 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

VI. 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 újhord és telehold idején. In: Kukovics Sándor – Jávora András: A fejlesztés lehetőségei a juhágazatban. JUHINNOV Platform, Budapest, 269-276 p. ISBN 978-963-08-0624-4.

Tudományos közlemény idegen nyelvű, lektorált folyóiratban:

Budai Cs. - Egerszegi I. - Oláh J. – Jávora A. – Kovács 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. – Oláh J. - Padeanu I. - Kovács A. - Jávora 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.- Kovács 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. – Kovács 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 (in press).

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 (8) 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) 6-8

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

Kovács A. – Budai Cs. (2011): Beszámoló a nemzetközi Nolana konferenciáról. Magyar Juhászat és Kecsketenyésztés: A Magyar Mezőgazdaság melléklete 20 (11) 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.

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

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