

Andrológiai jellemzők szezonális változásának összefüggése a sperma mélyhűthetőségével és in vitro fertilizációs képességével fekete racka kosoknál

Zárójelentés OTKA K76371

Őshonos állatfajtáink iránt folyamatosan nő az érdeklődés, ami indokolja a szaporító munka színvonalának emelését. A korszerű reprodukciós technikák alkalmazása nélkülözhetetlenné teszi a fajta-specifikus szaporodásbiológiai ismeretek megszerzését, a nőivarban és a hímivarban egyaránt.

Pályázatunk célja az őshonos magyar fekete racka kos szaporodás-élettani jellemzőiről teljes körű információ szerzése, ezen belül elsősorban annak tisztázása, hogy az erőteljesen szezonális szaporodási ciklussal bíró fajtában az évszakok ritmikus változása milyen hatással van a kosok ivari működésére, spermatermelésre és az apaállatok termékenyítő képességére. Tanulmányoztuk, hogy szezonális változás hogyan befolyásolja a kosok spermájának eltarthatóságát és mélyhűthetőségét. Vizsgálattárgyává tettük, hogy a tenyész szezonon kívül alkalmazott tartós melatonin kezelés milyen hatással van a hím nemi szervekre és azok működésére (a here exokrin és endokrin működésére; hormontermelés és spermiogenezis).

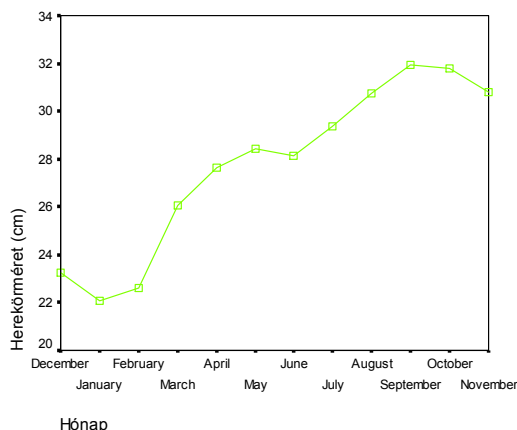
Tudomásunk szerint átfogó andrológiai vizsgálatokat racka fajtában korábban még nem végeztek, a témával kapcsolatos megállapításokat, vizsgálati eredményeket a szakirodalomban nem publikáltak még. Az itt közölt eredményeket, megállapításokat elsősorban a rackatenyésztők, de természetesen a kutatási program tapasztalatait más magyar őshonos juh fajtákat tartó tenyésztők is hasznosíthatják munkájuk során.

Vizsgálatainkat Herceghalomban az Állattenyésztési és Takarmányozási Kutatóintézet kísérleti telepén és a Szent István Egyetem Állatorvos-Tudományi Karán folytattuk.

I. A hereméreték szezonális változásának nyomon követése.

Programunkhoz kilenc 18-20 hónapos Hortobágyi fekete racka kost vontunk kísérletbe. Az állatokon egy éven keresztül kéthetente mértük a herék körméretét (Coulter Scrotal Tape, Trueman Mfg.). A mintavételeket, méréseket tél elejétől (december) ősz végéig (november) végeztük. Az adatokat egyutas variancia-analízissel (ANOVA) és Spearman korreláció analízissel értékeltük az SPSS 15.0 for Windows program segítségével.

Az átlagos here körméret a téli minimumtól ($22,64 \pm 0,18$ cm) az ősszel mért maximumig ($31,55 \pm 0,14$ cm) folyamatosan növekedett. A legkisebb, januári körméret ($22,08 \pm 0,18$ cm) 44,7%-os növekedés után szeptemberben érte el a legnagyobb méretét ($31,92 \pm 0,21$ cm) ($P < 0,001$). Szignifikáns különbséget ($P < 0,001$) láttunk a tavasz-tél, tavasz-nyár, tavasz-ősz, nyár-tél, nyár-ősz és ősz-tél évszakos értékek között. Megállapítottuk, hogy a here méretek alakulását az évszak jelentősen befolyásolja ($r = 0,87$, $P < 0,01$). Szignifikáns összefüggést láttunk a here körméret - naphosszúság ($r = 0,43$, $P < 0,05$), valamint a here körméret - havi középhőmérséklet ($r = 0,73$, $P < 0,01$) vonatkozásában (1. ábra).



1. ábra A here körméretek alakulása az évszakok függvényében

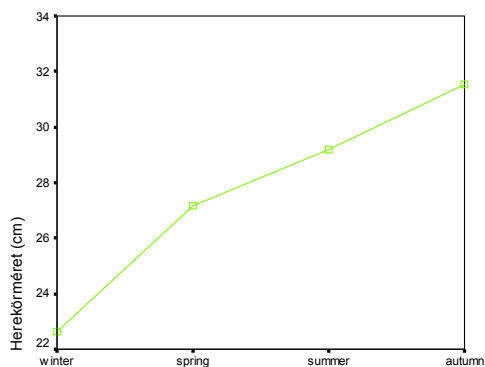
II. A here endokrin működésének vizsgálata GnRH-teszttel, valamint a tesztoszteron szekréció szezonális változásának tanulmányozása.

A tesztoszteron hormonszint szezonális változását – a hereméretek felvételével párhuzamosan – kéthetente, azonos időpontban gyűjtött (vena jugularis) vérmintákból határoztuk meg. A vérmintákat alvadás után 10 percig centrifugáltuk (1500 g), a szérumot a hormon analízisig -70°C -on tároltuk. A tesztoszteron koncentrációt ELISA módszerrel (Testosterone Elisa kit, DRG International) mértük.

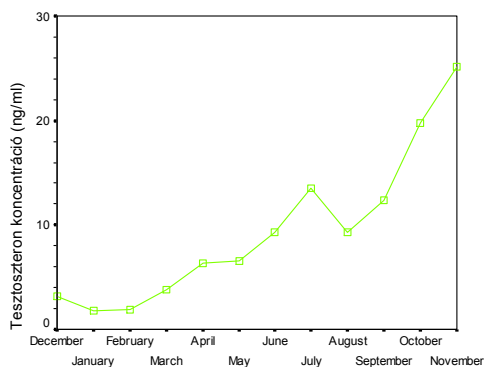
Évszakonként - mindig az évszak közepén - GnRH-teszttel is vizsgáltuk a here endokrin funkcióját. A kísérleti állatoktól vérmintákat gyűjtöttünk a tesztoszteron hormonszint alapértékének méréséhez. Ezt követően kisonként $50\mu\text{g}$ GnRH-t (Fertagyl, Intervet) applikáltunk iv. (GnRH stimulációs teszt), majd 90 perc elteltével újabb vérmintákat vettünk a provokált tesztoszteron koncentráció meghatározásához. A gyűjtött mintákat a hormon analízisig a fent leírtak szerint kezeltük. Az adatokat egyutas variancia analízissel (ANOVA) és Spearman korreláció analízissel értékeltük az SPSS 15.0 for Windows program segítségével.

Megegyezően a here méreteknél tapasztaltakkal, a legalacsonyabb tesztoszteron szintet a téli időszakban ($2,31\pm 0,14\text{ng/ml}$), a legmagasabbat ősszel regisztráltuk ($17,81\pm 1,07\text{ng/ml}$). A januárban mért legkisebb koncentráció ($1,79\pm 0,16\text{ng/ml}$) november hónapra 14x-esére emelkedett ($25,14\pm 2,41\text{ng/ml}$). Szignifikáns különbséget ($P<0,001$) állapítottunk meg a tavasz-tél, tavasz-nyár, tavasz-ősz, nyár-tél, nyár-ősz és ősz-tél évszagos értékek között.

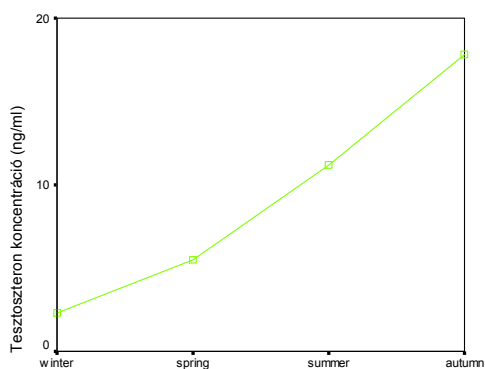
A GnRH-val provokált tesztoszteron koncentráció télen és tavasszal mért értékei közel azonosak voltak ($16,08\pm 0,57\text{ng/ml}$, ill. $16,66\pm 0,55\text{ng/ml}$), majd ennél szignifikánsan magasabb nyári ($28,51\pm 2,61\text{ng/ml}$, $P<0,001$) hormonszinteket követő további jelentős emelkedés után a maximális hormon koncentrációt ősszel a tenyész szezonban mértük ($54,02\pm 3,78\text{ng/ml}$). Szignifikáns különbséget ($P<0,001$) láttunk a tél-tavasz, tél-nyár, tavasz-nyár, tavasz-ősz és nyár-ősz hormonszintek között. A tesztoszteron koncentráció és a herekörméret között szignifikáns összefüggést ($r=0,62$, $P<0,01$ ill. $r=0,69$, $P<0,01$) állapítottunk meg (2. ábra). Erős évszak hatást is megfigyeltünk a hormon vérszintjének alakulásában ($r=0,71$, $P<0,01$, ill. $r=0,82$, $P<0,01$).



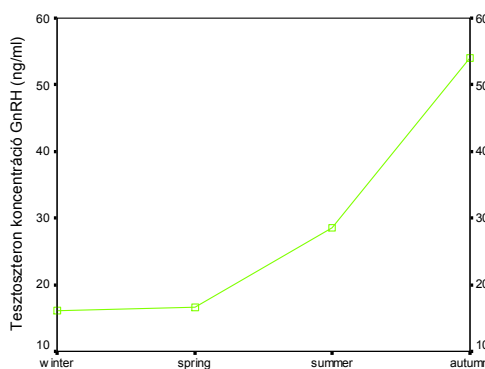
Évszak



Hónapok



Évszak



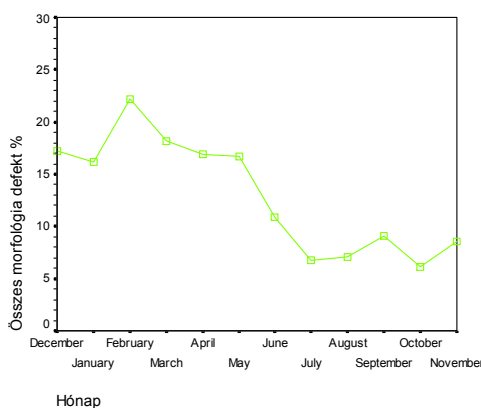
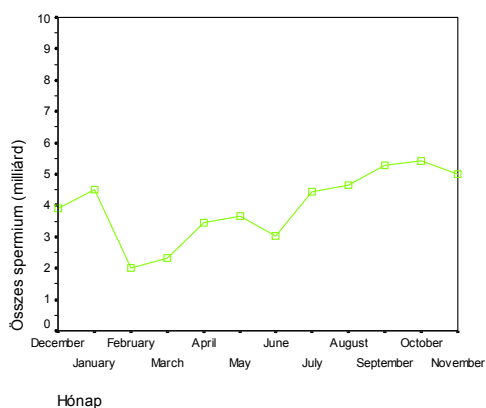
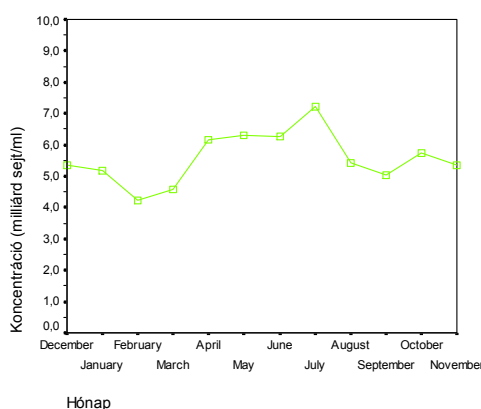
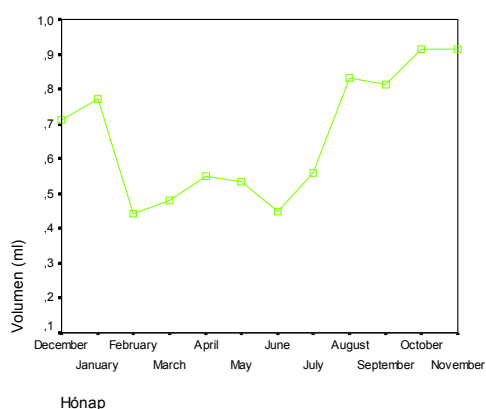
Évszak

III. Ejakulátumok komplex spermatológiai vizsgálata, a spermajellemzők szezonális változásának vizsgálata.

Az ondó gyűjtését minden állattól heti egy-két alkalommal műhüvely segítségével végeztük. Mértük az ejakulátum mennyiségét (VOL), a friss, hígítatlan ondóból fáziskontraszt mikroszkóppal 40x-es nagyításban értékeltük a spermiumok tömegmozgását (M), melyet 1-től 5-ig osztályoztunk. A spermium koncentráció (CC), ill. az ejakulátumonkénti összes spermium (TNSC) meghatározását sejtszámlálással (Bürker kamra) végeztük. A spermium morfológiai vizsgálatához hígított ondóból spermakinetet készítettünk, Cerovsky (1976) módszerével megfestettük, majd fénymikroszkóppal (Olympus BX51) 1000x-es nagyításban meghatároztuk a deformált ondósejtek (TMDC) arányát. Vizsgálataink során a kilenc kísérleti állat összesen 387 ejakulátumának kvantitatív és kvalitatív spermajellemzőit értékeltük. Az adatokat egyutas variancia analízissel (ANOVA) és Spearman korreláció analízissel értékeltük az SPSS 15.0 for Windows program segítségével.

Az ejakulátum mennyisége a tavaszi minimumtól ($0,52 \pm 0,03$ ml) az őszi maximumig ($0,88 \pm 0,03$ ml, $P < 0,001$) a júniusban tapasztalt csökkenés után ($0,44 \pm 0,05$ ml) folyamatosan növekedett. A legkisebb mennyiséget ($0,44 \pm 0,03$ ml) februárban, a legnagyobbat - azonos értékekkel - októberben, ill. novemberben ($0,91 \pm 0,05$ ml) regisztráltuk. A legalacsonyabb spermium koncentrációt ($4,92 \pm 0,13 \times 10^9$ /ml) télen, a legmagasabbat nyáron ($6,56 \pm 0,21 \times 10^9$ /ml), mértük ($P < 0,001$). Az ejakulátumonkénti összes spermiumszám (TNSC) tavasszal volt a legkisebb ($3,15 \pm 0,23 \times 10^9$ /ml), ősszel a legnagyobb ($5,22 \pm 0,45 \times 10^9$ /ml) ($P < 0,001$). Szignifikáns összefüggést láttunk a VOL – TNSC ($r = 0,89$, $P < 0,01$) és CC – TNSC ($r = 0,58$, $P < 0,01$) paraméterek vonatkozásában.

A spermium-motilitás februári alacsonyabb szintje ($4,42 \pm 0,20$) után a legjobb eredményeket azonos havi átlag értékekkel a nyári hónapokban (jún.,júl.,aug.) kaptuk ($5,00 \pm 0,00$, $P < 0,001$). A rendellenes ondósejtek aránya télen volt a legnagyobb ($18,48 \pm 3,23\%$), ősszel a legkisebb ($7,95 \pm 1,58\%$) ($P < 0,001$), és szignifikánsan magasabb volt februárban, mint az év egyéb hónapjaiban ($22,17 \pm 1,61\%$, $P < 0,001$ - $P < 0,02$). A legkevesebb deformált spermiumot októberben észleltük ($6,15 \pm 0,72\%$). Szoros negatív összefüggést láttunk a provokált tesztoszteron szint – TMDC kapcsolatban ($r = -0,86$, $P < 0,01$), közepesen erős negatív korrelációt az évszak - TMDC ($r = -0,55$, $P < 0,01$), és T- TMDC ($r = -0,43$, $P < 0,01$), vonatkozásában, valamint gyengébb kapcsolatot a TNSC – TMDC esetében ($r = -0,34$, $P < 0,01$). A here körméret és a TMDC között közepes negatív ($r = -0,50$, $P < 0,01$) összefüggést állapítottunk meg. Gyenge kapcsolat volt a here körméret – VOL, ($r = 0,23$, $P < 0,01$), valamint a here körméret – TNSC esetében ($r = 0,25$, $P < 0,01$).



IV. A folyékony sperma tárolása során fellépő membránkárosodás csökkentése a hígított termékenyítőanyag antioxidáns kezelésével tenyész szezonban és szezonon kívül.

A mesterséges termékenyítésben minden haszonállat fajnál, így a juh esetében is igen fontos a sperma termékenyítő képességének minél hosszabb ideig történő megőrzése. A kos sperma konzerválásában alapvető probléma, hogy a spermiumok membránjának magas a telítetlen zsírsav tartalma, amelyek könnyen megkötik az oxigént és nagyszámú peroxid kötés jön létre. E nem kívánt peroxidációs folyamatok a sejtmembrán roncsolódását, ezen keresztül a sperma termékenyítő képességének csökkenését eredményezik. Munkánk célja volt olyan spermakezelési eljárás kidolgozása, amely a káros peroxidációs folyamatok visszaszorításával segítene az ondósejt membránszerkezetének megővésében, a membrán permeabilitás megnövekedésének megakadályozásában, amely egyik fontos feltétele a

sperma konzerválásnak. Vizsgálatainkat két kísérletben, tenyész szezonon kívül (február), ill. a tenyész szezonban (november) végeztük. 9 tenyészérett fekete racka kos kevert ejakulátumából Na-citrát-glükóz-tojássárgája sperma hígítóval, valamint antioxidánsokkal és keverékekkel kezelt, 10^9 /ml spermamintákat készítettünk. A kezeléseket $15\mu\text{g}$ Resveratrol (R15), $25\mu\text{g}$ Resveratrol (R25), $15\mu\text{g}$ Q10 /Coenzim Q10/ (Q15), $25\mu\text{g}$ Q10 (Q25), 3mg E-vitamin (E3), 5mg E-vitamin (E5) antioxidánsokkal és $15\mu\text{gR}+3\text{mgE}$ (RE), $15\mu\text{gQ}+3\text{mgE}$, (EQ) és $15\mu\text{g R}+15\mu\text{g Q10}$ (RQ) keverékekkel végeztük. Az elkészített mintákat 10 napig 5°C -on tároltuk. A tárolási idő alatt a 0., 1., 3., 6., 8., és 10. napon CASA rendszerrel vizsgáltuk az ondósejtek mozgási paramétereit, valamint akroszóma festés után a sejtmembrán károsodás mértékét.

Szezonon kívüli kísérletünkben függetlenül a kezelésektől a tárolás alatt romlott az ondó minősége. Csökkent a motilitás, emelkedett a membrán sérülések aránya, bár az eltartás harmadik napjáig valamennyi kezelt mintában alacsonyabb spermium-motilitást mértünk, mint a kontroll spermában. A tárolás nyolcadik napjára a kontroll és az E3 mintában az ondósejtek elhaltak. A többi kezelt spermában még 45,5-65,4% (motilitás), ill. 26,1-44,9% (progresszív motilitás) közötti értékeket kaptunk. Antioxidánsok hatására kisebb mértékű volt a sejtmembrán károsodása, javult a sperma eltarthatósága, bár a keverékek nem nyújtottak hatékony védelmet a sejteknek. A kontrollhoz képest az eltartás első és hatodik napján az RE és QE, a harmadik napján mindhárom keverékkel kezelt mintában (RE, EQ, RQ) magasabb volt a sérült akroszómájú spermiumok aránya. Ugyanakkor az első (RE), a harmadik (QE) és a tizedik napon (RE) a CASA rendszerrel mért három, a hímivarsejtek mozgását jellemző (VAP, VCL, VSL) legmagasabb sebesség értékeket a keverékek esetében tapasztaltuk. Az R15, E3 és E5 kezeléseknél az első és harmadik napon kisebb mértékű membránkárosodást láttunk. Legjobb hatást a $15\mu\text{g}$ Resveratrol kezeléssel értük el. Az eltartás során a sejtmembrán károsodás mértéke ebben a mintában volt a legkisebb, a kísérlet nyolcadik napján 65,4% élő sejt arányt, 36,2% progresszív motilitást és mindössze 14,1% károsodott akroszómájú ondósejtet láttunk. Ez az arány a tizedik napra is csak 4%-al emelkedett. A Q10-el és E5-el kezelt minták az utolsó mérési napra elhaltak.

A tenyész szezonban lefolytatott kísérletünkben csak az eltartás első napján mértünk a kezeltéknél jobb spermium motilitás és sebesség értékeket a kontroll mintában. A tíznapos eltartás során a szezonon kívül végzett vizsgálatunk eredményeivel összehasonlítva valamennyi paraméter esetében magasabb értékeket mértünk. Elhalást nem tapasztaltunk. A kontroll mintában a progresszív motilitás ebben a vizsgálatban jobb volt, a tizedik napon még 41% körüli értéket mutatott. A kezelt minták közül a legjobb mozgást a harmadik (83,27%) és hatodik (74,29%) napon az E3, a nyolcadik, ill. tizedik napon a Q15 (76,63%) és R15 (56,07%) mintákban láttuk. A leggyengébb motilitást a hatodik napot kivéve a keverékekben mértük. A két kísérlet eredményeit összehasonlítva jelentős különbségeket figyeltünk meg a VAP, VCL, VSL adatokban is. Szezonon kívüli vizsgálatunkban a VAP érték (a hímivarsejt sebessége mozgásának átlagolt útvonala számolva) egyetlen esetet kivéve (1. nap RE $105\mu\text{m/s}$) $100\mu\text{m/s}$ alatt volt, míg a tenyész szezonban a minták 94%-a meghaladta a $100\mu\text{m/s}$

Antioxidánsokkal kezelt spermaminták eltarthatósági vizsgálata szezonon kívül

Dátum	Napok	Minták	Motilitás %	Prog mot %	VAP $\mu\text{m/s}$	VCL $\mu\text{m/s}$	VSL $\mu\text{m/s}$	Akroszóma sérülés %
2010.02.09	0	K	93.09	87.91	102.50	175.80	86.40	5.75
2010.02.10	1	K	93.17	85.79	94.76	151.90	83.74	8.60
2010.02.10	1	R15	85.30	77.18	98.35	160.80	87.62	5.25
2010.02.10	1	R25	78.78	69.79	96.34	161.00	85.71	9.66
2010.02.10	1	Q15	89.32	78.82	97.08	163.40	84.48	10.00
2010.02.10	1	Q25	76.60	67.91	91.88	156.00	82.29	8.00
2010.02.10	1	E3	82.80	71.81	94.55	157.00	83.64	6.50
2010.02.10	1	E5	78.35	60.64	77.68	128.40	67.61	7.50
2010.02.10	1	RQ	87.74	70.31	86.70	153.00	76.17	7.75
2010.02.10	1	RE	77.62	68.51	105.00	165.50	92.07	12.50
2010.02.10	1	QE	83.99	64.43	79.91	138.50	70.19	10.25
2010.02.12	3	K	87.15	76.06	75.23	122.80	67.95	10.25
2010.02.12	3	R15	75.38	50.94	50.96	85.54	43.38	7.75
2010.02.12	3	R25	78.47	64.77	73.34	123.40	65.74	12.00
2010.02.12	3	Q15	81.90	62.67	77.20	130.20	67.73	9.75
2010.02.12	3	Q25	66.74	52.61	79.30	132.80	72.33	9.00
2010.02.12	3	E3	80.71	65.73	72.12	120.10	63.19	8.25
2010.02.12	3	E5	84.98	63.24	73.55	121.70	65.83	8.25
2010.02.12	3	RQ	60.26	44.98	69.81	121.50	62.30	16.00
2010.02.12	3	RE	63.19	49.08	72.64	124.40	65.01	13.00
2010.02.12	3	QE	56.46	42.63	82.74	138.40	74.86	16.00
2010.02.15	6	K	52.41	31.36	54.54	86.68	48.47	19.66
2010.02.15	6	R15	67.20	40.64	59.93	100.80	52.78	10.66
2010.02.15	6	R25	74.51	50.00	54.55	97.99	47.53	15.00
2010.02.15	6	Q15	68.61	51.14	57.09	96.36	50.92	18.66
2010.02.15	6	Q25	63.09	47.27	47.20	86.44	38.92	17.66
2010.02.15	6	E3	75.21	47.06	58.20	95.48	52.28	14.75
2010.02.15	6	E5	76.54	36.78	44.23	79.28	36.56	11.75
2010.02.15	6	RQ	59.34	38.80	49.95	93.28	40.86	13.50
2010.02.15	6	RE	67.41	45.82	51.44	93.38	43.14	25.00
2010.02.15	6	QE	69.04	42.76	53.53	99.40	44.64	17.33
2010.02.17	8	K	Ø					
2010.02.17	8	R15	65.45	36.21	52.21	91.07	46.31	14.16
2010.02.17	8	R25	58.42	44.91	56.68	96.07	49.66	18.75
2010.02.17	8	Q15	60.19	31.17	38.27	67.05	31.52	21.00
2010.02.17	8	Q25	45.54	28	44.82	83.55	37.73	18.50
2010.02.17	8	E3	Ø					
2010.02.17	8	E5	46.09	26.17	47.9	81.43	41.37	19.00
2010.02.17	8	RQ	62.52	37.08	44.7	81.39	37.52	19.25
2010.02.17	8	RE	65.13	41.62	52.48	92.82	45.71	19.50
2010.02.17	8	QE	52.05	37.38	51.85	89.48	45.22	14.80
2010.02.19	10	K	Ø					
2010.02.19	10	R15	69.71	36.19	37.57	67.55	31.28	18.33
2010.02.19	10	R25	51.87	42.52	41.86	78.86	34.29	20.33
2010.02.19	10	Q15	Ø					
2010.02.19	10	Q25	Ø					
2010.02.19	10	E3	Ø					
2010.02.19	10	E5	Ø					
2010.02.19	10	RQ	57.54	36	42.57	77.91	35.18	22.80
2010.02.19	10	RE	28.98	19.03	51.55	88.84	45.43	27.33
2010.02.19	10	QE	30.36	17.86	41.78	74.86	34.54	32.66

értéket. Jelentős különbségeket tapasztaltunk a VCL (a hímivarsejt sebessége a ténylegesen megtett teljes mozgási útvonalára számolva), és VSL (a hímivarsejt sebessége mozgásának kiindulási és végpontja közötti távolságra számolva) adatokban is (táblázat). Az eltartás során mindkét kísérletben a sejtmembrán sérülés aránya a Resveratrollal (R15) kezelt mintában volt a legalacsonyabb.

Antioxidánsokkal kezelt spermaminták eltarthatósági vizsgálata szezonban

Dátum	Napok	Minták	Motilitás %	Prog.mot. %	VAP $\mu\text{m/s}$	VCL $\mu\text{m/s}$	VSL $\mu\text{m/s}$	Akroszóma sérülés %
2011.11.08	0	K	94.31	83.61	107.20	154.80	91.72	4.00
2011.11.09	1	K	90.20	84.40	135.00	214.40	119.80	16.17
2011.11.09	1	R15	83.84	78.51	129.10	204.10	112.50	8.58
2011.11.09	1	R25	85.43	79.37	132.80	212.30	119.10	8.91
2011.11.09	1	Q15	81.01	71.11	124.50	207.70	112.50	20.13
2011.11.09	1	Q25	80.24	69.56	122.50	196.10	109.60	11.88
2011.11.09	1	E3	88.61	81.40	130.80	212.60	114.30	12.21
2011.11.09	1	E5	81.12	68.02	124.30	197.60	109.00	19.80
2011.11.09	1	RQ	87.01	79.89	123.30	194.00	108.40	18.15
2011.11.09	1	RE	79.19	67.96	133.40	205.90	120.50	18.48
2011.11.09	1	EQ	83.81	69.06	116.50	182.40	100.70	33.66
2011.11.11	3	K	84.24	80.65	117.40	182.70	103.00	22.77
2011.11.11	3	R15	74.83	67.81	121.20	162.60	108.80	17.82
2011.11.11	3	R25	75.70	70.08	121.10	195.60	111.40	22.11
2011.11.11	3	Q15	81.47	75.61	123.20	202.10	110.80	24.75
2011.11.11	3	Q25	73.23	65.92	126.40	206.80	115.90	21.45
2011.11.11	3	E3	86.96	83.27	121.80	195.50	103.00	18.48
2011.11.11	3	E5	82.34	72.44	95.63	161.50	79.10	18.81
2011.11.11	3	RQ	77.76	68.72	117.10	192.20	103.00	25.74
2011.11.11	3	RE	70.36	58.16	116.80	191.00	106.40	40.92
2011.11.11	3	EQ	75.36	61.05	109.00	179.60	96.16	44.55
2011.11.14	6	K	55.63	48.41	100.20	159.50	92.69	37.95
2011.11.14	6	R15	57.59	53.31	110.60	185.60	101.30	23.76
2011.11.14	6	R25	66.36	60.00	119.60	196.30	109.00	22.77
2011.11.14	6	Q15	55.26	47.77	118.40	190.80	111.30	32.34
2011.11.14	6	Q25	73.17	69.42	128.40	207.10	115.10	32.67
2011.11.14	6	E3	77.69	74.29	125.30	194.00	114.40	28.71
2011.11.14	6	E5	63.51	53.25	115.00	191.50	106.80	32.34
2011.11.14	6	RQ	62.5	50.76	115.60	189.90	105.70	46.20
2011.11.14	6	RE	68.32	59.12	114.50	189.10	102.20	44.55
2011.11.14	6	EQ	59.84	50.10	126.70	202.30	116.00	52.47
2011.11.16	8	K	70.63	67.18	112.10	170.50	99.92	35.97
2011.11.16	8	R15	76.39	69.79	108.30	179.30	94.86	23.76
2011.11.16	8	R25	69.76	62.94	118.80	192.30	105.30	29.04
2011.11.16	8	Q15	81.55	76.63	121.60	196.40	105.90	39.27
2011.11.16	8	Q25	77.04	72.57	123.90	203.30	110.10	30.03
2011.11.16	8	E3	77.10	72.71	121.40	197.20	106.80	30.03
2011.11.16	8	E5	78.41	73.25	125.70	200.60	111.40	41.91
2011.11.16	8	RQ	59.45	54.13	126.70	201.80	115.80	50.49
2011.11.16	8	RE	67.92	57.30	127.30	197.60	119.40	43.23
2011.11.16	8	QE	78.32	70.07	125.40	195.60	114.20	73.24
2011.11.18	10	K	54.80	40.90	88.70	149.00	81.30	42.90
2011.11.18	10	R15	60.20	56.07	119.00	190.00	107.00	33.33
2011.11.18	10	R25	44.80	39.60	109.00	178.00	101.00	41.25
2011.11.18	10	Q15	70.30	42.51	110.00	184.00	96.80	42.90
2011.11.18	10	Q25	42.50	27.90	101.00	176.00	94.70	42.57
2011.11.18	10	E3	58.50	47.15	105.00	175.00	95.30	57.75
2011.11.18	10	E5	45.00	23.97	105.00	179.00	96.90	52.80
2011.11.18	10	RQ	13.50	8.89	69.00	134.00	65.50	68.64
2011.11.18	10	RE	40.30	28.99	103.00	177.00	69.10	48.12
2011.11.18	10	QE	33.90	26.25	101.00	164.00	95.60	77.33

Ellentétben a mozgási paraméterek esetében tapasztaltakkal, valamennyi vizsgálati napon a szezonon kívüli kísérletben születtek jobb eredmények, 39-53%-al kevesebb sérült akroszómájú ondósejtet láttunk, mint a másik kísérletben.

A reaktív oxigéngyökök elleni védelemmel kapcsolatos kutatási programjainkban továbbra is fontos feladatunk újabb kísérletekkel az ehhez szükséges leghatékonyabb anyagok és optimális koncentrációik kiválasztása. Egy megfelelő spermakezelési eljárás kidolgozása a peroxidációs folyamatok visszaszorításával segítene az ondósejt membrán szerkezetének megóvásában, a permeabilitás megnövekedésének megakadályozásában, amely fontos feltétele a spermakonzerválásnak, az eredményes sperma mélyhűtésnek.

V. Racka kosok spermájának mélyhűtése tenyész szezonban és szezonon kívül. A fagyasztott/felolvasztott sperma termékenyítő-képességének in vitro becslése, előrejelzése.

A racka kosok esetében két jól elkülöníthető időszak figyelhető meg a sperma manipulálhatóságát tekintve, a nyári-őszi és a téli-tavaszi évszak. Az ejakulátum mennyiség (>0,6 ml), az összes spermium szám (>3,5x10⁹ sejt/ejakulátum) és a morfológiai defektusok számát (<10%) tekintve is a nyári-őszi időszak a legmegfelelőbb a sperma fagyasztására (p<0,05). A sperma minták mélyhűtését az eredetileg tervezett tris-bázisú hígító helyett Andromed (Minitube, Germany) hígítóval végeztük. A motilitás vizsgálatot követően 1:1 arányban hígítottuk az ejakulátumokat, majd a végtérfogatot 0,3 x10⁹ sejt/ml állítottuk be. A mintákat fokozatosan 5°C-ra hűtöttük és 2 óra ekvibrációt követően 0,5 ml-es szalmákba töltöttük, majd N₂ gőzben 8 percig fagyasztottuk. A minták motilitását 38°C-on 20 másodpercig tartó felolvasztás és 10 perces inkubálás után CASA rendszerrel ellenőriztük. A spermiumok morfológiáját, az élő/elhalt sejtek arányát és az akroszóma státuszát Kovács és Foote-féle festéssel értékeltük. A felolvasztást követően relatíve magas 40-60%-os értékeket kaptunk (52,4±4,35% motilitás és 49,3±5,1% progresszív motilitás). A fent leírt spermológiai jellemzőknek megfelelően szignifikáns különbség mutatható ki a szezonban (nyár-ősz) és szezonon kívül mélyhűtött minták között (p<0,05), valamint az egyedek között is. A mintákban az élő-ép sejtek előfordulási aránya 30-45%, ami jelzi a módszer további tökéletesítésének szükségességét.

VI. Tenyész-szezonon kívül alkalmazott tartós melatonin kezelés hatása a here endokrin és exokrin működésére, valamint az állat energetikai állapotára

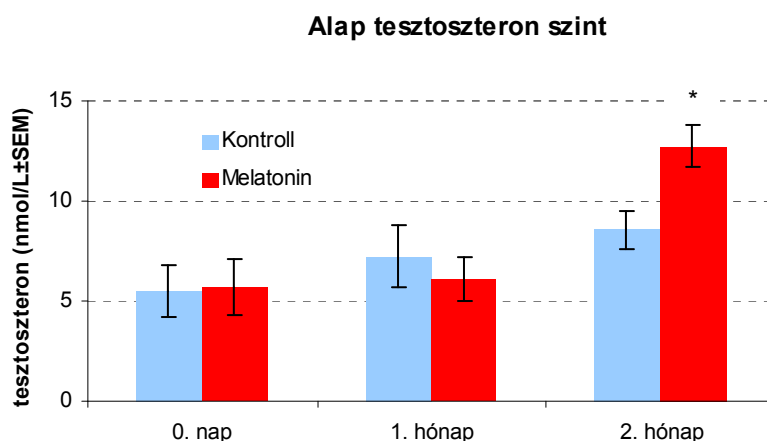
Az évszakok (tenyész szezon és tenyész szezonon kívüli időszak) váltakozásáról (megvilágított órák számának változása) a melatonin hormon „tájékoztatja” az állatokat. A VI. kísérletsorozatban az állatok energetikai állapotával kapcsolatban vizsgáltuk a plazma βOH-vajsav (BHB) és szabad zsírsav (NEFA) szintjét (NEFA és BHB: Randox Laboratoires Ltd, Ardmore, UK). A plazma melatonin szintjét egy eredetileg humán célra kifejlesztett, laboratóriumunkban juh fajra validált direkt ¹²⁵I-RIA módszerrel határoztuk meg (Melatonin direct RIA RE29301, IBL-International, Hamburg, Germany). A here Leydig-sejtjeinek aktivitását az alap tesztoszteron szint és a GnRH terhelésre adott tesztoszteron válasz meghatározásával jellemeztük. A GnRH-stimulációs teszt során 0.008 mg buszerelin (Receptal inj.®, Intervet, Angers, France) intravénás adagolását követően a 30., 60., 90. és 120. percben gyűjtöttünk vérmintát. Az analízis vérplazma-mintákból, egy eredetileg humán célra kifejlesztett ³H-RIA módszer (Csernus, 1982) előzetesen juh fajra is adaptált és validált változatával (Kulcsár, 2007) történt.

Az átlagokat Student-féle T-próbával hasonlítottuk össze. A szignifikancia szintet $P < 0,05$ értékben határoztuk meg.

Két csoportot alakítottunk ki (kezelt és kontroll). A kezelt csoport egyedei május hónapban, majd kb. 1 hónappal később 1-1 db szubkután melatonin implantátumot kaptak (Melovine, CEVA, France), ami 18 mg melatonint tartalmaz. Három alkalommal végeztük el az un. stimulációs tesztet A kísérleti és a kontroll csoportban (a melatonin kezelés megkezdésekor /0. nap/, majd 1 /kb. 30. nap/ és 2 hónappal /kb. 60. nap/ később).

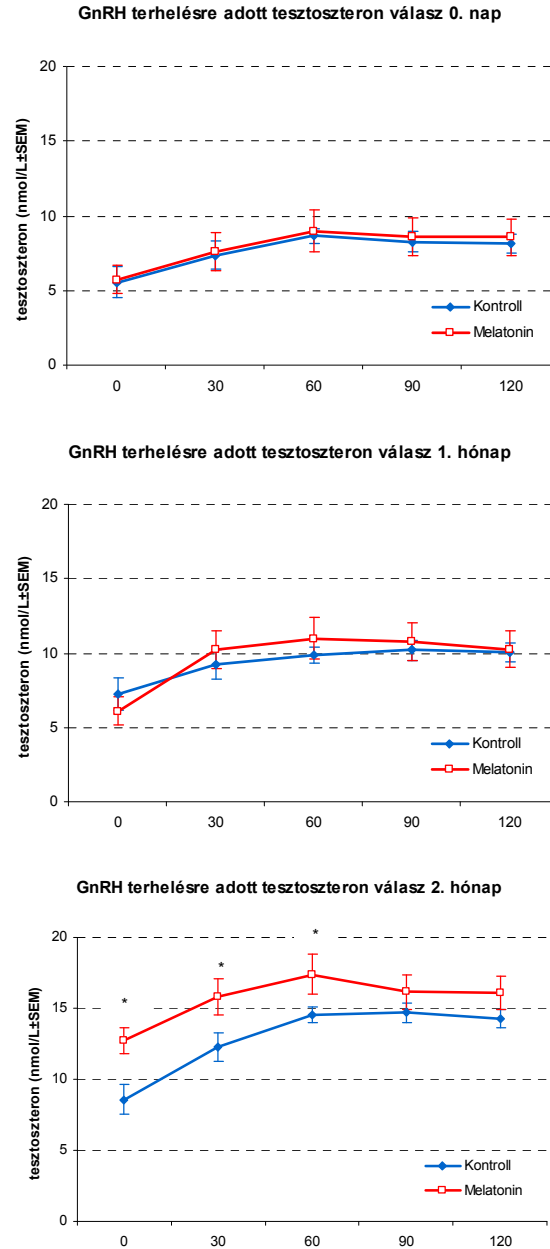
Endokrin funkció; tesztoszteron produkció

A kísérlet megkezdése előtt (0. nap) gyűjtött vérplazmákból mért alap tesztoszteron szintek a két csoportban azonosak voltak. Ugyanakkor az alap tesztoszteron szint a kísérlet 2. hónapjában gyűjtött mintákban szignifikánsan magasabb volt a melatoninnal kezelt állatokban a kontrollhoz képest (3. ábra).



3. ábra Az alap tesztoszteron szint alakulása melatoninnal kezelt és kontroll rackakosokban (*: $P < 0,05$).

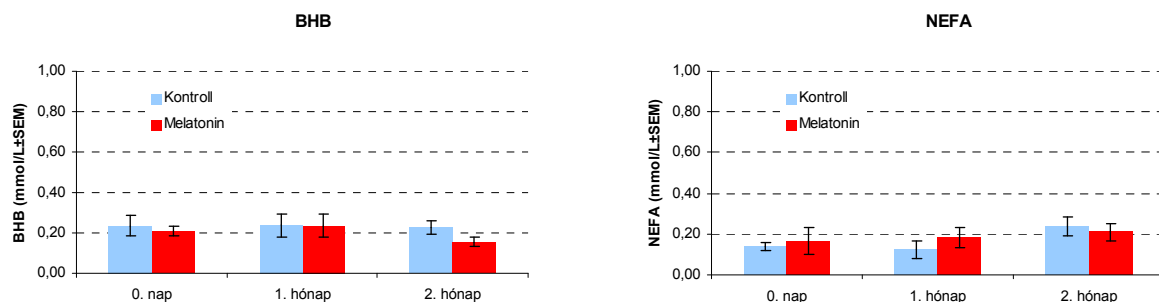
A GnRH terhelésre adott tesztoszteron válasz a kísérlet 0. napján és az 1 hónap után gyűjtött mintákban nem mutatott eltérést a kezelt és kontroll csoport között. Ugyanakkor a kísérlet második hónapjában végzett terheléses teszt során az alapszintek megemelkedése mellett a 30. és 60. percen mért értékek is szignifikánsan magasabbak voltak a melatoninnal kezelt kosokban (4. ábra). A tesztoszteron szint megemelkedésével egy időben a herék körmérete is megnövekedett.



4. ábra A GnRH termelésre adott tesztoszteron válasz alakulása melatoninnal kezelt és nem kezelt racka kosokban (*: $P < 0,05$)

Energetikai állapot; plazma metabolitok

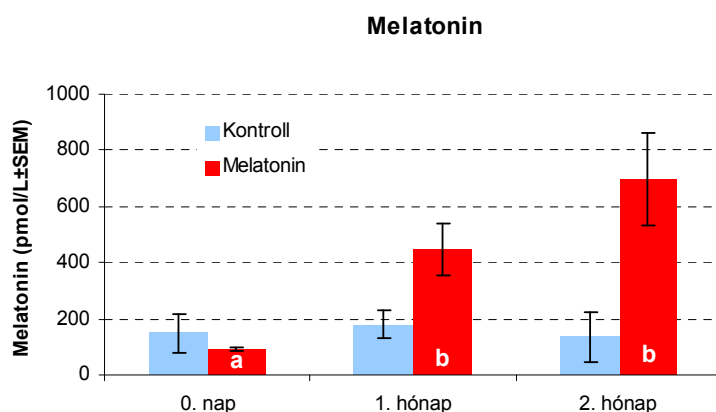
A vizsgált metabolikus paraméterek (BHB és NEFA szintek) mind a melatoninnal kezelt, mind a kontroll csoportban mindvégig a fiziológiás határértékeken belül voltak, negatív energia egyensúlyra utaló emelkedett értéket (≥ 1.60 mmol/l, vagy egymást követően két mintában: ≥ 1.20 mmol/l; BHB szinteket (Henze et al., 1998) egyetlen alkalommal sem tapasztaltunk (5. ábra).



5. ábra A plazma β OH-vajsav (BHB) és szabad zsírsav (NEFA) szintjének alakulása Melatoninnal kezelt és Kontroll racka kosokban.

Melatonin szint alakulása

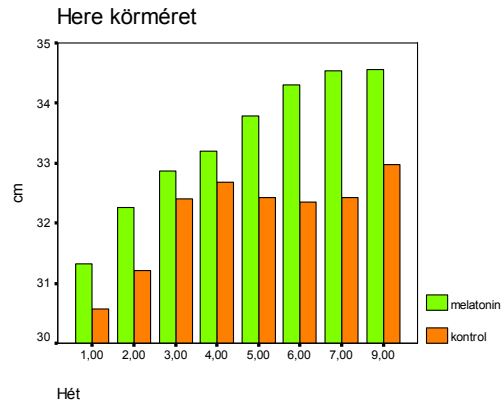
A plazma melatonin szintjének vizsgálata alapján a melatonin implantátum a kezelt (Melatonin) csoportban hatékonyan működött, a kezelés 1. hónapjában a nappal gyűjtött vérmintákból mért melatonin szintek szignifikánsan magasabbak voltak a 0. naphoz képest ($445,3 \pm 91,55$ vs. $92,4 \pm 9,15$ pmol/L; $P=0,03$). Az 1. hónap végén beültetett 2. implantátum hatására a melatonin szint tovább emelkedett ($699,45 \pm 163,91$ pmol/L; $P=0,02$ a 0. naphoz képest) (6. ábra).



6. ábra A plazma melatonin szintjének alakulása a melatoninnal kezelt és a kontroll racka kosokban nappal gyűjtött vérmintákból. (a és b jelzésű esetekben $P < 0.05$)

Spermatológiai paraméterek alakulása

A spermatológiai alap paraméterekben nem találtunk különbséget a melatoninnal kezelt és a kontroll csoport között. A here körméret alakulásában azonban igen. A melatoninnal kezelt egyedek esetében szignifikánsan nagyobb here körméreteket tapasztaltunk.



Összefoglalva

Megállapíthatjuk, hogy a magyarországi őshonos racka kosok esetében a tenyészszezonon kívül alkalmazott lassú kioldódású melatonin kezelés hatására a here körméretének növekedését tapasztaltuk, továbbá a kezelés pozitívan befolyásolta a herék endokrin funkcióját (tesztoszteron termelését). A spermatológiai paraméterekben nem tapasztaltunk különbséget a kezelt és a nem kezelt/kontroll csoportok között. Ez talán azzal magyarázható, hogy a kosoktól egész éven keresztül folyamatosan gyűjtöttük a spermát. A rendszeres spermavétel – feltételezhetően – hozzájárult a sperma minőségének „karbantartásához”, amelynek eredményeként az ejakulátum minősége még szezonon kívül is nagyon jónak mutatkozott. Így a melatonin kedvező hatása nem érvényesülhetett. Természetesen ennek a jelenségnek a bizonyítása további vizsgálatokat igényel.