

10. SZAPORODÁSBIOLOGIAI TALÁLKOZÓ

AZ IVARSEJTEKTŐL A SZÜLETÉSIG

FROM GAMETES UNTIL BIRTH

Kiskunmajsa, 2003. november 14–15.

TARTALOM – CONTENT

<i>Barna J.</i> : Előszó (Preface)	2
<i>Révay, T. – Kovács, A.</i> : Hogyan segíti a citogenetika a szaporodásbiológiát (bivaly, jak, lajhár példákön). (The linkage between cytogenetics and reproductive biology (examples on water buffalo, yak and two-toed sloth species)).....	3
<i>Solti, L.</i> : A háziállatok vemhesítése. (Fertilisation in domestic animals).....	4
<i>Szenci, O. – Beckers, J.F.</i> : Embrionális mortalitás diagnosztikai lehetőségei szarvasmarhában. (Recent possibilities for the diagnoses of embryonic mortality in the cow).....	6
<i>Huszenicza, Gy.</i> : A kanca petefészkek-működése az ellés utáni időszakban. (Ovarial function of mares postpartum)	9
<i>Nagy, Sz.</i> : Az automatizált spermaértékelés fejlesztési lehetőségei: flow citometria (New directions in the development of automatized semen quality control: flow cytometry).....	14
<i>Sasser, G. – Gábor, Gy. – Tóth, F.Ms.</i> : Korai vemhesség diagnosztizálása ELISA teszt segítségével szarvasmarhában és egyéb kérődzőkben. (Early pregnancy detection by an ELISA test in cattle and other ruminants)	15
<i>Magyar, K.</i> : A juhok intrauterin termékenyítésének eredményességét befolyásoló tényezők. (Factors influencing fertility after intrauterine artificial insemination (A.I.) of sheep)	17
<i>Bali Papp, Á.Ms. – Varga, E.Ms. – Kiss, V.Ms.</i> : Sertés embriók mélyhűtésének lehetőségei. (Possibilities of pig embryo freezing).....	18
<i>Baranyai, B. – Gócza, E.Ms. – Bodó, Sz.</i> : Biopsziált egér és szarvasmarha embriók vitrifikálása mikrocsepp technikával. (Vitrification of biopsied mouse and bovine embryos with a microdrop technique)	20
<i>Varga, Á. – Végi, B.Ms. – Liptói, K.Ms. – Barna, J.Ms.</i> : Újabb <i>in vitro</i> módszerek használata baromfiondósejtek mélyhűtést követő termékenyítőképességének vizsgálatára. (New methods for the evaluation of fertilizing ability of frozen/thawed poultry spermatozoa)	22
<i>Bodrogi, L. – Bodó, Sz. – Gócza, E.Ms. – Carstea, B. – Hiripi, L. – Révay, T. – Kovács, A. – Bősze, Zs.Ms.</i> : Ivarsejt kiméra nyulak létrehozása mikroinjektációs módszerrel. (Production of germline chimera rabbits by microinjection).....	25
<i>Cseh, S. – Konc, J. – Kanyó, K.Ms.</i> : Embriómanipuláció páviánokon és egyéb fajokon. (Embryo manipulation in the baboon and in other species)	29
<i>Szalai-Mátray, E.Ms. – Szalai, T. – Harka, L.Ms.</i> : Mesterséges termékenyítés a krajnai méh (<i>Apis mellifera carnica</i>) tenyésztési programjában. (Artificial insemination in Carniolan bee (<i>Apis mellifera carnica</i>) breeding program).....	32
<i>Zomborszky, Z.</i> : A genetikai diverzitás megőrzésének lehetőségei gímszarvasban. (Preservation of gene diversity in red deer).....	36
<i>Proháczik, A.Ms. – Kulcsár, M.Ms. – Huszenicza, Gy.</i> : A vadászgörény (<i>Mustela putorius furo</i>) ivari működésének jellemzői és befolyásolásának lehetőségei. (Endocrine treatment procedures used to suppress the cyclic ovarian function in domestic ferrets (<i>Mustela putorius furo</i>)	41
<i>Flink, F.</i> : Európai Unió előírások az embrió-átültetés területén. (EU regulations of the embryo transfer)	43

A 10. Szaporodásbiológiai találkozó anyaga szerkesztve, de lektorálás nélkül került közlésre. (Proc. 10th Meeting of Hungarian Society for Animal Reproduction, edited but not supervised)

ELŐSZÓ

Az 1991-ben alakult a Szaporodásbiológiai Társaság, melynek szakmai elődje, működő Magyar Agrártudományi Egyesület Állatorvosok Társasága Szaporodásbiológiai Szakosztálya (megszűnt 1990-ben) volt, éppen 10 évvel ezelőtt, 1993-ban indította el „Szaporodásbiológiai Találkozó” címmel, évente megrendezésre kerülő tudományos összejövetelét. A konferenciák témájának vagy az adott év valamilyen szaporodásbiológiai eseménye, vagy egy-egy téma arra az évre jellemző gyakorlati, illetve elméleti fontossága adott aktualitást. Eleinte egy-egy állatfaj (szarvasmarha, sertés) szaporodásbiológiai vonatkozású kutatási eredményei szerepeltek a palettán, 1997-ben a mesterséges megtermékenyítés 50. éves múltja adta a találkozó apropóját, 2002-ben a hazai szaporodásbiológiai kutatóműhelyek bemutatása volt a fő cél, míg 2003-ban a 25. éves hazai múltra tekintő embrió-átültetés emléküléséhez kapcsolódott a konferencia tematikájának egy része. Idén társaságunk komoly törekvése az ICAR (International Conference on Animal Reproduction) hazai megrendezési lehetőségének pályázat útján történő megszerzése.

Az utóbbi években tudatosan kezdtük bevonni rendezvényeinkbe a legfiatalabb kutatókat is, és ezzel egyidejűleg, az előadások körét, az emlős fajokon kívül, kibővítettük egyéb állatfajokkal, valamint — tekintettel arra, hogy a biotechnológia évszázadát éljük — szerettünk volna több hangsúlyt fektetni a legújabb biotechnológiai kutatások bemutatására is, ami az elmúlt két rendezvény programját alapvetően meghatározta.

Sajnálatosnak tartjuk, hogy az alap kutatások bemutatásának bevonásával, sok korábbi, elsősorban a szaporodásbiológia gyakorlati kérdései iránt érdeklődő, rendszeres konferencia-résztvevőt — úgy tűnik — elveszítettünk. Bizunk benne, hogy ez a folyamat csak átmeneti, a régi kollégák visszatérnek rendezvényeinkre, valamint az új, fiatal kutatók rendszeres részvételével is tovább fog bővülni a hallgatóság létszáma.

Az Állattenyésztés és Takarmányozás c. folyóirat immár harmadik éve vállalja, hogy a rendezvényen szereplő előadások teljes anyagát, vagy az összefoglalóit megjelenteti, hogy ezzel még több szakma iránt érdeklődő kollégánk megismerje a hazai szaporodásbiológiai kutatások jelenlegi témáit, az elért legújabb eredményeket, és azok művelőit, megkönnyítve ezzel a kapcsolatfelvétel lehetőségét is. Úgy érzem, legutóbbi rendezvényünk is rendkívül változatos és tartalmas volt az állatfajokat és az új kutatási eredményeket illetően, ezért jó szívvvel ajánlom mindenki figyelmébe.

A Szaporodásbiológiai Társaságról, a tevékenységéről, illetve a belépési lehetőségekről bővebb információ a www.szapbiol.hu honlapon áll az érdeklődők rendelkezésére.

This is the Proceeding of 10th Meeting of the Hungarian Society for Animal Reproduction titled as „From gametes until birth“ Each of the paper (summary of full text) is in Hungarian but with English summaries. More about the papers at the authors (addresses are at the end of each papers), and about our Society in www.szapbiol.hu

Barna Judit

HOGYAN SEGÍTI A CITOGENETIKA A SZAPORODÁSBIOLOGIÁT (BIVALY, JAK, LAJHÁR PÉLDÁKON)

RÉVAY TAMÁS — KOVÁCS ANDRÁS

SUMMARY: THE LINKAGE BETWEEN CYTOGENETICS AND REPRODUCTIVE BIOLOGY (EXAMPLES ON WATER BUFFALO, YAK AND TWO-TOED SLOTH SPECIES)

Animal cytogenetics celebrates its 40th anniversary in 2004. Today's cytogeneticist, aiming to reveal chromosomal abnormalities manifest at the phenotypic level or in the production traits, "borrows" several methods from the molecular biological field. Fluorescence in situ hybridization (FISH) transfers the resolution of classical chromosomal investigations to the level of genes and molecular markers. Using FISH a particular chromosome, gene involved in an abnormality can be recognized not only in metaphase chromosome preparations, but also in interphase nuclei. The authors present examples of sex-chromosome analysis of water buffalo (*Bubalus bubalis*, L.) and yak (*Bos grunniens*, L.) by FISH, which make possible the recognition of sex of spermatozoa, thus can be a test method for the sexing experiments.

Xenarthras are blank spots in the "cytogeneticist" map". The numerical polymorphism and difficulties of sex-determination described in the two-toed sloth, can limit the effective zoo-breeding.

Az állattenyésztési citogenetika mintegy negyven éves tudományterület. A fenotípusosan, vagy a termelési paraméterekben megjelenő rendellenességek kromoszómális szinten történő megismerését szolgáló metodikák napjainkban a molekuláris biológia eszköztárából is merítkeznek. A fluorescens *in situ* hibridizáció (FISH) a kromoszómális vizsgálatok felbontóképességét a gének, molekuláris markerek szintjére transzportáló módszer. Segítségével az egyes kromoszómák, a rendellenességért felelős gének már nem csak kromoszómákon, hanem interfázisos sejtmagokban is felismerhetők. Az előadásban a citogenetikailag jól ismert bivaly (*Bubalus bubalis*, L.) és jak (*Bos grunniens*, L.) fajok ivari kromoszómáit érintő vizsgálatokat mutatunk b. Ezek lehetővé teszik a különböző ivarú spermiumok felismerését, ami az ivarspecifikus termékenyítő anyag előállítását célzó vizsgálatok hatékonyságának tesztelő módszere lehet.

A citogenetika fehér-foltja a vendégizületesek. A kétujjú lajhár (*Choloepus didactylus*, L.) néhány eddig vizsgált egyedében leírt meghökkentő numerikus polimorfizmus, és az ivar meghatározás nehézségei, a hatékony állatkerti szaporítás korlátja lehet.

Szerzők címe: Révay, T.: Kisállattenyésztési és Takarmányozási Intézet

Authors' address: Institute for Small Animal Research
H-2101 Gödöllő, Pf. 417.

Kovács, A.: Állattenyésztési és Takarmányozási Kutatóintézet

Research Institute for Animal Breeding and Nutrition
H-2053 Herceghalom, Gesztenyés u. 1.

A HÁZIÁLLATOK VEMHESÍTÉSE

SOLTI LÁSZLÓ

SUMMARY: FERTILISATION IN DOMESTIC ANIMALS

Supporting reproduction has been a major goal of animal breeders for many centuries, because domestic animal species live in an environment which is unnatural and production is possible only if reproductive processes are undisturbed.

The methods used range from the selection the animals in heat and ready for conception up to the most recent assisted reproductive technologies. Historical data suggest that the first artificial insemination was performed in the XIV. century, when Arab horse breeders collected stallion semen by inserting a sponge into the vagina of a bred mare. Leeuwenhoek was the first to recognise spermatozoa in the human ejaculate by using a self-constructed microscope. One century had to elapse before Spallanzani performed the first successful artificial insemination in the dog, and it took another 100 years until this technique was extended to other domestic animal species.

Several important developmental milestones invented by the Russian, later on by Danish, French and Japanese scientists which resulted in the worldwide use of the artificial insemination with deep frozen semen today. Recently, efforts are being made to evaluate semen objectively along with the gender selection of inseminates.

Amióta az ember egyes állatfajokat háziasított, különleges figyelmet fordít azok szaporodására. Nem csupán azért, mert a természetes élőhelyüktől eltérő körülmények között tenyésztett állatok reprodukcióját segíteni kell, hogy elérjék, vagy meghaladják vadon élő társaikét, hanem mert a tejtermelő egyedek szaporodás nélkül termelni is képtelenek.

A szaporítás támogatása évezredekken keresztül az ivarzó nőtények kiválogatásából és a hozzájuk párosításra kijelölt hímek fizikai közelségbe hozásából állt. A mai értelemben vett mesterséges termékenyítés csupán néhány évtizedes múltra tekinthet vissza, holott a technika alapja egyáltalán nem új, azt a természet is széles körben alkalmazza a méhek, és más rovarok által beporzott növényeknél.

Máig ellenőrizetlen történet szerint a 14. században, arab lótenyésztők egy hüvelybe helyezett szivacs segítségével lopták el a rivális csapatok lovaitól a spermát, amellyel azután saját kancáikat vemhesítették. 1678-ban, *Leeuwenhoek* és segédje, a maguk által szerkesztett mikroszkóp segítségével megfigyelték az ejakulátumban jelen lévő spermiumokat, ám további egy évszázadnak kellett eltelnie, amíg *Spallanzani* az első sikeres termékenyítést végrehajtott a kutyán (1784). Ezt követően újabb száz évig tartott, amíg Cambridge-ben, *Walter Heape* (1897), és más országokban többen, egymástól függetlenül nyúl, kutya és ló sikeres termékenyítéséről számoltak be. A módszer gyakorlati felhasználását az állattenyésztésben, az orosz *Ivanov* alapozta meg, aki 1907-től kezdődően sikeres kísérleteket végzett (kutya, róka, nyúl és baromfi) és spermahigítót dolgozott ki, valamint szakembereket képzett lovak mesterséges termékenyítésére. Munkásságát, amelyről 1922-ben angol nyelvű szakközleményt is publikált, *Milovanov* folytatta. Ő fejlesztette ki a róla elnevezett műhüvelyt és más eszközöket, amelyekhez hasonlókat ma is széles körben használunk. Az orosz iskolát tanulmányozta *Nishikawa*, aki Japánba hazatérve, mun-

katársaival együttműködve, rutinszerű termékenyítést végzett szarvasmarhán, juhon, kecskén, sertésen és baromfin, ám eredményeik mindaddig ismeretlenek maradtak, amíg *Niwa* és *Nishikawa*, több angol nyelvű publikációban összefoglalva, azt 1958–1972 között megjelentették.

A mesterséges termékenyítésről beszélve nem hagyható figyelmen kívül a dán *Sørensen*, aki jól ismerte az orosz csoport munkásságát, és kidolgozta a szarvasmarha esetében ma is használatos rectovaginalis technikát, majd 1936-ban megalakította az első termékenyítő állomást, méghozzá már az első évben igen jó (59%) vemhesülési eredménnyel. Ugyanő találta föl a műszalmát (1940), amit *Cassou* (1964) fejlesztett üzemi szintre és forgalmazott világszerte.

Mérföldkőnek számított a brit *Polge* által kidolgozott spermamélyhűtési eljárás, házikakas ondósejtjeivel, ami a 0,25 ml-es műszalmában történő fagyasztás és a folyékony nitrogénben tárolás bevezetésével, világszerte elterjedtette a szarvasmarha mesterséges termékenyítését. Olaszországban, *Spallanzani* korai kutatásai nyomdokain tovább haladva, *Amantea* (1914) kutyák részére műhüvelyt fejlesztett ki, ami előfutára volt a bikák, mének és kosok számára kifejlesztett orosz műhüvelyeknek. Egy másik olasz, *Bonadonna*, együttműködve a svéd *Lagerlöf*-fel, megszervezte az első International Congress on Animal Reproduction (Milánó, 1948), amelyik 4 évenként megrendezve, máig az állat-szaporodásbiológia legjelentősebb seregszemléje. *Lagerlöf* és az ugyancsak svéd *Blom* (akinek a komparációs spermakamráját hosszú ideig elterjedten használták) számos kutatást végeztek és publikáltak a rendellenes morfológiájú spermiumok termékenységére gyakorolt hatásairól.

A jövő útja egyelőre beláthatatlan, de bizonyára szerepet fog kapni benne a már ma is mind gyakoribb objektív számítógépes sperma-analízis (CASA), az áramlási citometriával ivardeterminált sperma használata és olyan tartósítási-termékenyítési eljárások (mikrokapszulázott vagy liofilizált sperma, vitrifikált sperma, mély intrauterin termékenyítés, stb.), amelyek a módszer alkalmazását kifizetőddé teszik olyan esetekben is, ahol ma ez még nem gyakorlatias.

Szerző címe: Szent István Egyetem, Állatorvos-tudományi Kar
Author's address: Szent István University, Faculty of Veterinary Science
H-1400 Budapest, Pf. 2.

EMBRIONÁLIS MORTALITÁS DIAGNOSZTIKAI LEHETŐSÉGEI SZARVASMARHÁBAN

SZENCI OTTÓ — BECKERS, JEAN FRANCOIS

SUMMARY: RECENT POSSIBILITIES FOR THE DIAGNOSES OF EMBRYONIC MORTALITY IN THE COW

The achievement of an optimum calving to conception interval of 85 to 115 days requires concentrated management activities during the first 100 days following calving. Accurate and early detection of pregnant and non-pregnant cows, as well as cows with late embryonic mortality, may be a key factor in achieving an optimal calving to conception interval.

One of the most recent techniques for the diagnosis of early pregnancy and late embryonic mortality in cattle on the farm is B-mode ultrasonography. The reliability of the test greatly depends on the frequency of the transducer used. The accuracy of a 5 MHz transducer for the detection of the conceptus from 20 days after AI onwards has been investigated by several authors, but under field conditions acceptable results could only be achieved from 26 to 27 days after service (*Pieterse et al.*, 1990; *Szenci et al.*, 1990; *Hanzen and Laurent*, 1991). However, *Badtram et al.* (1991) reported an accuracy of 69% and 72% for pregnant and non-pregnant cows, respectively, using ultrasonography between 23 and 31 days after insemination. In these cases the confirmation of ultrasonic diagnoses was based on palpation per rectum of the uterus at 2 to 3 months after AI or on spontaneous return to oestrous after AI. Under controlled experimental conditions, the accuracy of a 7.5 MHz linear-array transducer for early pregnancy diagnosis was 100% by Day 20 (*Boyd et al.*, 1990; *Kastelic et al.*, 1991). However, similar results could not be reached in field studies (*Szenci et al.*, 1995, 1998).

Bovine pregnancy specific protein B (bPSPB) and/or bovine pregnancy associated glycoprotein 1 (bPAG1) are expressed in the trophoblastic binucleate cells and secreted in the maternal circulation (*Sasser et al.*, 1986; *Zoli et al.*, 1992). Detection of these proteins in the maternal blood can be a good indicator of the presence of a live embryo (*Semambo et al.*, 1992; *Szenci et al.*, 1998).

Progesterone production by the corpus luteum plays an essential role in the establishment and the maintenance of pregnancy and a progesterone assay around day 21–23 has been proposed as a pregnancy test in farm animals. However, this test is not specific for the presence of a live conceptus in the uterus (*Humbolt et al.*, 1988).

The present review is undertaken to summarise the most important methods for the diagnoses of early pregnancy and late embryonic mortality in the cow (*Szenci et al.*, 2000, 2003). The advantages and disadvantages of the different methods are also discussed.

Általánosan elfogadott, hogy a mesterséges termékenyítést követően az állatok 88–90%-a fogamzik (*Ayalon*, 1978). Mások szerint ez az arány üzemi körülmények között jelentősen túlbecsült (*Sreenan és Diskin*, 1986). Ugyanakkor az egyszeri mesterséges termékenyítést követően az állatoknak csak az 55%-a ellik le (*Diskin és Sreenan*, 1980). Ebből következően a fertilitási arány (88–90%) és a tulajdonképpeni szaporulat (55%) között mintegy 33–35% különbség van, vagyis az embrionális mortalitás mintegy 33–35%-ban fordul elő. Az is elfogadott, hogy arányban a vemhesség 8–18. nap között, amikor az összes embrionális mortalitás a fogamzástól kezdve folyamatosan, mégis az összes mortalitáshoz viszonyítva, mintegy 75–80%-ban fordul elő (*Diskin és Sreenan*, 1980; *Roche és mtsai*, 1981). A mesterséges termékenyítést követő 42. nap után a magzati elhalás mintegy 5–8%-ra tehető (*Boyd és mtsai*, 1969).

Az embrionális mortalitás diagnózisára vonatkozóan, az irodalomban, kevés adat áll rendelkezésre. Ennek fontosságát az is hangsúlyozza, hogy az embrio-

nális mortalitást ténylegesen előidéző kóroktani vizsgálatokat csak megbízható diagnosztikai módszerek birtokában lehetséges elkezdni. Összefoglalónknak az a célja, hogy ismertesse azokat a vemhességi diagnosztikai módszereket, melynek segítségével az embrionális mortalitás is diagnosztizálható, hogy ezáltal is hozzájárulhassunk a két ellés közötti időszak csökkentéséhez.

Jelenlegi ismereteink szerint, üzemi körülmények között, a korai vemhességet és a késői embrionális mortalitást legegyszerűbben B-képeljáráson alapuló ultrahangvizsgálattal állapíthatjuk meg. A vizsgálat pontossága függ a használt vizsgálófej frekvenciájától. A mesterséges termékenyítést követő 20. naptól kezdődően többen vizsgálták az 5 MHz-es vizsgálófejjel végzett diagnosztikai munka pontosságát, de üzemi körülmények között csak a termékenyítést követő 26–27. nap után kapható elfogadható eredmény (*Pieterse és mtsai, 1990; Szenci és mtsai, 1990; Hanzen és Laurent, 1991*). Ezzel szemben, *Badtram és mtsai (1991)*, a mesterséges termékenyítést követő 23–31. nap között csak 69%, ill. 72%-os pontossággal tudták a vemheseket és a nem vemheseket diagnosztizálni. Az ultrahangvizsgálatok eredményeit rendszerint 2–3 hónappal a MT után, rektális vizsgálattal, ill. a visszaivarzásokkal erősítették meg.

Kísérleti körülmények között, 7,5 MHz-es vizsgálófej használatával, a korai vemhességet, a termékenyítés utáni 20. naptól kezdődően 100%-os pontossággal állapították meg (*Boyd és mtsai, 1990; Kastelic és mtsai, 1991*). Ezzel szemben üzemi körülmények között nem tudtuk a korai vemhességet hasonló pontossággal megállapítani (*Szenci és mtsai, 1995, 1998ab*).

A vemhességi fehérjéket (PSPB és/vagy PAG1) a trophoblast eredetű binuclealis sejtek termelik, amelyek az anyai véráramba is bekerülnek (*Sasser és mtsai, 1986; Zoli és mtsai, 1992*), ezáltal meghatározásuk a vemhességre nézve specifikus módszernek tekinthető (*Semambo és mtsai, 1992; Szenci és mtsai, 1998ab*).

A sárgatest progeszteron termelése fontos szerepet játszik a vemhesség kialakulásában és fenntartásában. A termékenyítést követő 20–23. napon vett mintákból (vér, tej) a korai vemhesség is megállapítható. Az élő embriót tekintve a módszer nem specifikus, mivel csak arról tájékoztat, hogy a háttérben sárgatest fázis van (*Humbolt és mtsai, 1988*).

Vizsgálatainkból azt a következtetést vonhatjuk le, hogy a PSPB, a PAG1 és a progeszteron-koncentráció egyidejű meghatározása, valamint az ultrahangvizsgálat lehetőséget nyújt a késői embrionális/fetális mortalitás során bekövetkező kórélettani elváltozások tanulmányozására annak érdekében, hogy a kiváltó okokat megismerhessük, ill. megelőzhessük (*Szenci és mtsai, 2000, 2003*).

IRODALOM

- Ayalon, N.*(1978): A review of embryonic mortality in cattle. *J. Reprod. Fert.*, 54. 483–493.
- Badtram, G.A. – Gaines, J.D. – Thomas, C.B. – Bosu, W.T.K.*(1991): Factors influencing the accuracy of early pregnancy detection in cattle by real-time ultrasound scanning the uterus. *Theriogenology*, 35. 1153–1167.
- Boyd, J. – Bacisch, P. – Young, A. – McCracken, J.A.*(1969): Fertilization and embryonic losses in dairy cattle. *Br. Vet. J.*, 125. 87–97.
- Boyd, J.S. – Omran, S.N. – Ayliffe, T.R.*(1990): Evaluation of real-time B-mode ultrasound scanning for detecting early pregnancy in cows. *Veterinary Record*, 127. 350–352.

- Diskin, M.G. – Sreenan, J.M.*(1980): Fertilization and embryonic mortality rates in beef heifers after artificial insemination. *J. Reprod. Fert.*, 59. 463–468.
- Hanzen, C. – Laurent, Y.*(1991): Application de l'échographie bidimensionnelle au diagnostic de gestation et l'évaluation de l'incidence de la mortalité embryonnaire dans l'espèce bovine. *Annales Médecine Veterinaires*, 134. 481–487.
- Humblot, P. – Camous, S. – Martal, J. – Charlery, J. – Jeanguyot, N. – Thibier, M. – Sasser, R.G.* (1988): Diagnosis of pregnancy by radioimmunoassay of a pregnancy-specific protein in the plasma of dairy cows. *Theriogenology*, 30. 257–267.
- Kastelic, J.P. – Bergfelt, D.R. – Ginther, O.J.*(1991): Ultrasonic detection of the conceptus and characterization of intrauterine fluid on days 10 to 22 in heifers. *Theriogenology*, 35. 569–581.
- Pieterse, M.C. – Szenci, O. – Willemsse, A.H. – Bajcsy, A.Cs. – Dieleman, S.J. – Taverne, M.A.M.* (1990): Early pregnancy diagnosis in cattle by means of linear-array real-time ultrasound scanning of the uterus and a qualitative and quantitative milk progesterone test. *Theriogenology*, 33. 697–707.
- Roche, J.F. – Boland, M.P. – McGeedy, T.A.*(1981): Reproductive wastage following artificial insemination in heifers. *Vet. Rec.*109. 401–403.
- Sasser, R.G. – Ruder, C.A. – Ivani, K.A. – Butler, J.E. – Hamilton, W.C.*(1986): Detection of pregnancy by radioimmunoassay of a novel pregnancy-specific protein in serum of cows and a profile of serum concentrations during gestation. *Biol. Reprod.*, 35. 936–942.
- Semambo, D.K.N. – Eckersall, P.D. – Sasser, R.G. – Ayliffe, T.R.*(1992): Pregnancy-specific protein B and progesterone in monitoring viability of the embryo in early pregnancy in the cow after experimental infection with *Actinomyces pyogenes*. *Theriogenology*, 37. 741–748.
- Sreenan, J.M. – Diskin, M.G.*(1986): The extent and timing of embryonic mortality in the cow. In: Embryonic mortality in farm animals. *Sreenan, J.M. – Diskin, M.G.* (eds), Martinus Nijhoff Publishers., Dordrecht, 1-11.
- Szenci, O. – Beckers, J.F. – Humblot, P. – Sulon, J. – Sasser, R.G. Taverne, M.A.M. – Varga, J. – Baltusen, R. – Schekk, Gy.*(1998b): Comparison of ultrasonography, bovine pregnancy specific protein B, and bovine pregnancy associated glycoprotein. 1 test for pregnancy in dairy cows. *Theriogenology*, 50. 77–88.
- Szenci, O. – Beckers, J.F. – Sulon, J. – Bevers, M.M. – Börzsönyi, L. – Fodor, L. – Kovács, F. – Taverne, M.A.M.*(2003): Effect of induction of late embryonic mortality on plasma profiles of pregnancy associated glycoproteins in heifers. *Vet. J.*, 165. 307–313.
- Szenci, O. – Gyulai, Gy. – Nagy, P. – Kovács, L. – Varga, J.*(1995): Taverne MAM. Effect of uterus position relative to the pelvic inlet on the accuracy of early bovine pregnancy diagnosis by means of ultrasonography. *Vet. Quart.*, 17. 37–39.
- Szenci, O. – Humblot, P. – Beckers, J.F. – Sasser, G. – Sulon, J. – Baltusen, R. – Varga, J. – Bajcsy, Cs.Á. – Taverne, M.A.M.*(2000): Plasma profiles of progesterone and conceptus proteins in cows with spontaneous embryonic/fetal mortality as diagnosed by ultrasonography. *Vet. J.*, 159. 287–290.
- Szenci, O. – Piros, A. – Kovács, L.*(1990): Early bovine pregnancy diagnosis by a battery operated portable ultrasonic scanner the "Ultra-Scan". *Proceedings 16th World Buiatrics Congress, Salvador*, 219–223.
- Szenci, O. – Taverne, M.A.M. – Beckers, J.F. – Sulon, J. – Varga, J. – Börzsönyi, L. – Hanzen, Ch. – Schekk, Gy.*(1998a): Evaluation of false ultrasonographic diagnoses in cows measuring plasma levels of bovine pregnancy associated glycoprotein (bPAG). *Vet. Rec.*, 142. 304–306.
- Zoli, A.P. – Guibault, L.A. – Delahaut, P. – Ortiz, W.B. – Beckers, J.F.*(1992): Radioimmunoassay of a bovine pregnancy-associated glycoprotein in serum: its application for pregnancy diagnosis. *Biol. Reprod.*, 46. 83–92.

Szerzők címe: Szenci, O.: Szent István Egyetem, Állatorvos-trudományi Kar, Nagyállat Klinika
Authors' address: SZIE, Faculty of Veterinary Science,
 H-2225 Üllő-Dóra major
Beckers, J.F.: Physiology of Animal Reproduction, Faculty of Veterinary
 Medicine, University of Liege
 B-4000 Liege, B41, Sart Tilman, Belgium

A KANCA PETEFÉSZEK-MŰKÖDÉSE AZ ELLÉS UTÁNI IDŐSZAKBAN (OVARIAL FUNCTION OF MARES POSTPARTUM)

HUSZENICZA GYULA

Az elmúlt évtizedben a ló, mint sport célokra, és/vagy kedvtelésből tartott állat iránti érdeklődés hazánkban is jelentősen fokozódott, ami örvendetesen együtt jár a faj szaporodásbiológiai tulajdonságai iránti érdeklődés megnövekedésével. Az ellés utáni időszak valamennyi házi emlős fajban, így a kancában is kitüntetett jelentőséggel bír a szaporodóképesség későbbi alakulását illetően. A kanca ellés utáni időszaka abban különbözik a többi gazdasági haszonállattól, hogy mind a méh involúciója, mind a petefészkek-működés ellés utáni ciklikussá válása rendszerint gyorsan lezajlik. Ennek köszönhetően már 1–2 héttel az ellés után megvan a lehetősége az új vemhesség kialakulásának. Ez a szaporodás-életteni sajátosság az evolúciós nyomás (a fajfenntartáshoz szükséges évenkénti ellések) és a hosszú vemhességi idő hatására alakult ki (*Ginther*, 1992).

A méh involúciója kancában

A méh ellés utáni visszaalakulásának a faji sajátosságait a közelmúltban, egy összefoglaló közleményünkben tekintettük át, így a terjedelmi korlátokra tekintettel — meghatározó klinikai jelentősége ellenére — a kérdést ezúttal nem részletezzük (*Nagy és mtsai*, 2003).

A petefészkek-működés ellés utáni ciklikussá válása

A kanca ellés utáni első látható ivarzása és első ovulációja: Az ellés utáni első látható ivarzási tünetek már az 5–11. napon jelentkezhetnek (*Mészáros és Ócsag*, 1978; *Ginther*, 1992). Ezt az ivarzást csikósárlásnak (foal heat) nevezzük. Megoszlanak a vélemények ennek gyakoriságáról. Egyesek szerint az ellés utáni 20. napon belül kezdődő ivarzásokat tekinthetjük csikósárlásnak, és csak néhány kancán (5–10%) nem figyelhetők meg ivarzási tünetek ebben az időszakban (*Bain*, 1957; *Becze*, 1981; *Haraszti*, 1987; *Ginther*, 1992). Mások szerint azonban lényegesen nagyobb (30–40%) a csikósárlást nem mutatók aránya (*Du Plessis*, 1964; *Kulcsár és mtsai*, 1989; *Volkman és mtsai*, 1992; *Quintero és mtsai*, 1996).

Loy (1980) angol telivéreken végzett vizsgálatai szerint a pp első ovuláció általában a 10–11. napon következik be, a kancák kb. 97%-a ovulál az első 20 napon. Meglehetősen gyakori azonban, hogy az első ovulációra több mint 30 nappal az ellés után kerül sor. Ezt főként az év korai szakaszában (január–március) ellett kancákra találták jellemzőnek. Hasonló eredményekről számos kutatócsoport beszámolt, de az utóbbiak szerint az ellést követő első ovuláció időpontja rendszerint néhány nappal későbbre (13–16. nap) tehető (*Henneke és Kreider*, 1979; *Hodge és mtsai*, 1982; *Henneke és mtsai*, 1984; *Kubiak és mtsai*, 1989; *Koskinen*, 1991). Kancában is előfordulhat, hogy az első ovuláció körül ivarzási tünetek nem lépnek föl (*Holtan és mtsai*, 1975; *Nett és mtsai*, 1975; *Volkman és mtsai*, 1992).

A petefészek-működés ciklikussá válásának hormonális háttere

A pp első ovuláció gyors kialakulása szorosan összefügg az ekkor tapasztalható gonadotrop változásokkal. Az ellés előtt néhány nappal kancában kifejezett FSH szintemelkedés mutatható ki, ami maximumát az ellés napján éri el, majd utána gyorsan csökken (Turner és mtsai, 1979). Valójában két FSH csúcs figyelhető meg: az első 12, a második pedig 2 nappal az ellés előtt. Ez hasonlít a ciklikus kancákban lezajló folyamatokhoz: az első emelkedés kb. 24, a második pedig, kb. 12 nappal az ovuláció előtt figyelhető meg. Valószínű, hogy az ellés után ennek hatására gyorsul föl látványosan az antralis tüszők fejlődése (Irvine és Evans, 1976). Az FSH szintjének az ellés előtti emelkedése a feto-placentáris egység gátló hatásának megszűnésével, vagy az ellés folyamatának fizikai és hormonális változásaival függ össze (Ginther, 1992). Az FSH szintje az ellést követően fokozatosan csökken. Petefészek-irtott kancákban ez a csökkenés elmarad (Irvine és Evans, 1976; Turner és mtsai, 1979). Az exogén GnRH-ra adott FSH-válasz közvetlenül az ellés előtt és azt követően nem változott, jelezve azt, hogy a hypophysis FSH-raktárainak hormontermelése/telítettsége állandó szinten van (Nett és mtsai, 1987; Nett és mtsai, 1989; Harisson és mtsai, 1990b). Az FSH-val ellentétben, a gesztációs periódus utolsó heteiben a plazma LH szintje alacsony, a HEL LH raktárai üresek (Irvine és Evans, 1976; Turner és mtsai, 1979; Nett és mtsai, 1987, 1989). Az exogén GnRH-ra adott maximális LH-válasz a vemhesség második felében (240. és 320. nap) alacsony, majd az ellés után fokozatosan emelkedik, a csikósárlás első napján magasabb, mint a pp 3–6. napon. Ez azt jelzi, hogy a HEL LH raktárai az ellést követően gyorsan feltöltődnek (Nett és mtsai, 1987, 1989; Harisson és mtsai, 1990b). Ezzel összhangban a plazma átlagos LH szintje a pp 2. naptól az ovulációig fokozatosan emelkedik (Nett és mtsai, 1975; Irvine és Evans, 1976; Noden és mtsai, 1978; Turner és mtsai, 1979; Hodge és mtsai, 1982; Fitzgerald és mtsai, 1985; Sargent és mtsai, 1988). A korai pp időszakában az FSH és az LH alapszekréciója lóban is pulzáló jellegű, a hullámok közel azonos időpontban jelentkeznek (Hines és mtsai, 1987). A csikósárlás második felében a preovulációs tüsző által termelt E_2 hatására (pozitív feed-back) az LH gyorsabb emelkedése tapasztalható (Turner és mtsai, 1979), kialakul a fajra jellemzően több napos tartamú preovulációs LH-csúcs, majd bekövetkezik az ovuláció.

Az E_2 és a P_4 az ellést követő első napon már alapszinten van. A P_4 koncentrációja csak az első ovulációt követően, az első CL kialakulása nyomán emelkedik újra. Ezzel szemben az E_2 a ciklikus állatok preovulációs időszakához hasonlóan már az első tüszőrepedést megelőzően emelkedik (Nett és mtsai, 1973; Holtan és mtsai, 1975; Nett és mtsai, 1975; Hunt és mtsai, 1978; Noden és mtsai, 1978). A plazma E_2 koncentrációjának emelkedése a látható ivarzások jelentkezésétől függetlenül alakul ki. Egyes szerzők szerint azonban a csikósárlást nem mutató kancákban az E_2 ovulációt megelőző emelkedése nem figyelhető meg (Loy és mtsai, 1975).

Az ellés utáni első ovuláció idejének meghatározása nem elegendő a kancák petefészek-működésének jellemzésére. Ugyanis az első ovuláció bekövetkezte nem minden esetben jelenti egyben a petefészek-működés ciklikussá válásának kezdetét is. Sokkal pontosabban tájékoztat a kancák P_4 -profiljának a meghatározása. A kérdéskörrel foglalkozó munkák közül azonban csak kevés terjed túl az első tüszőrepedés időszakán (Henneke és mtsai, 1984; Kubiak és mtsai, 1989).

A petefészek-működés ciklikussá válását befolyásoló tényezők

Kancában az ellés naptári helye, azaz az évszak az a legfontosabb külső tényező, mely az ellés után a petefészek-működés ciklikussá válását, és az első ivarzás kialakulását befolyásolja. Az elléstől az első ovulációig tartó idő januártól júniusig folyamatosan csökken: az első 10 napon ovulálók aránya szignifikánsan több májusban (83%), mint januárban és februárban (33%) (Loy, 1980). A vonatkozó saját vizsgálatainkat megelőzően is számos — köztük saját előzetes — megfigyelés (Palmer és Driancourt, 1983; Allen, 1985; Kulcsár és mtsai, 1989; Koskinen, 1991) tanúsította, hogy a 20. napnál későbbi első ovuláció (*pp. aciklia*), valamint az *interovulációs idő meghosszabbodása* lehetőségével elsősorban az év korai szakaszában ellő kancákban kell számolnunk. Ebben az időszakban a *pp* petefészek-működés az ellés pozitív és a szezon negatív hatása alatt áll. Főként e két tényező közötti kölcsönhatástól függ az év korai szakaszában ellő kancák *pp* petefészek-működése. A szezon hatása elsősorban a fényperiódus változásához kötődik. A májusi ellést megelőző rövid nappalos megvilágításban (8 óra fény), a kancákban gyakori volt az első ovuláció késlekedése, vagy a petefészek-működés ciklikusságának a későbbi leállása. Az év korai szakaszában ellő kancák *pp* petefészek-működése az ellést megelőző két hónappal kezdett mesterséges fénykiegészítéssel (16 óra) hatékonyan befolyásolható (Palmer és Driancourt, 1983). Koskinen és mtsai (1991) szerint az elléstől az első ovulációig eltelt idő szignifikánsan hosszabb volt azokban a kancákban, amelyek csak 10 hétnél rövidebb ideig részesülnek fénykezelésben. A szezon negatív hatását az is bizonyítja, hogy az év korai szakaszában ellett kancákban az LH-csúcs az első ovuláció idején alacsonyabb, mint a második ovuláció idején. Júliusi ellések után ez a különbség nem figyelhető meg (Hodge és mtsai, 1982). Az év korai szakaszában ellett kancák plazma LH koncentrációja az első ovulációt megelőzően magasabb, ha korábban fénykiegészítésben részesültek (Silvia és Fitzgerald, 1991).

A vizsgálatok egy része alátámasztani látszik a csikó jelenlétének, illetve a szoptatásnak a negatív szerepét is. Ginther és mtsai (1972) azt tapasztalták, hogy a csikó születéskori eltávolítása gyorsítja az ellés utáni első sárlás megjelenését és a petefészek follicularis aktivitását (az ellés utáni 6. napon a domináns tüsző mérete nagyobb volt csikójukat nem szoptató kancákban). Egyes vélemények szerint a csikó jelenléte gátolja az első ovuláció kialakulását, valamint csökkenti a 6–10. napon mért LH koncentrációt és az FSH átlagát, az ovulációt megelőző 10 napban (Turner és mtsai, 1979). Egy kísérletben a szoptatások idejének csökkentése gyorsította az első ovuláció kialakulását a vizsgálat első évében, de nem befolyásolta a másodikban (Henneke és Kreider, 1979). Mások szerint azonban a csikó 24 órára történő eltávolítása nem befolyásolta az elléstől az első sárlásig és ovulációig terjedő idő hosszát, valamint az LH alapszekréciójának jellemzőit (pulzus-frekvencia, amplitúdó) (Sargent és mtsai, 1988). Ezen eltérő eredmények miatt a *laktációs anósztrusz* fogalmának használata kancák esetén ellentmondásos. Egyes szerzők az ivarzások elmaradását, illetve az aciklia ellés utáni kialakulását a szoptatás és tejtermelés következményének tartják (Allen, 1985).

Az egyéb fajokban szerzett tapasztalatok alapján feltételezhető volt, hogy a még növekedésben levő, fiatal kancákban az első tüszőrepedés később következik be, mint a végleges testtömegüket már elért egyedekben. Saját vizsgálataink kezdetéig azonban ezt kísérletesen nem igazolták.

A vemhesség végén és a korai laktáció idején az energia-bevitel szintje, illetve ezzel összefüggésben a tápláltsági állapot kancában is jelentősen befolyásolhatja a

petefészek működését, illetve annak ellés utáni ciklikussá válását. E hatás valószínűleg elsősorban attól függ, hogy a kanca milyen kondícióban ellik, és a laktáció/szojtatás idején hogyan változik — javul, vagy romlik — a tápláltsági állapota. Egyes megfigyelések szerint azokban a kancákban, amelyeknek az ellés után javult a kondíciója, bizonyos határok között csökkent az elléstől az első ovulációig eltelt idő és nőtt a preovulációs tüsző maximális mérete (Godoi és mtsai, 2002). Megfelelő tápláltsági állapotban ellő kancák petefészek-működése azonban akkor sem károsodik, ha az állatok az ellés után valamelyest veszítenek kondíciójukból (Ginther, 1992). Valószínűnek látszik, hogy lóban a túltápláltság nem befolyásolja számottevően a petefészek ellés utáni működését (Kubiak és mtsai, 1989). Ugyanakkor rossz kondícióban ellő, és a későbbiekben is rossz tápláltsági állapotú kancákban csökkent az első ovulációt megelőző LH-szekréció, és szignifikánsan meghosszabbodott az elléstől a második ovulációig eltelt idő (Henneke és mtsai, 1984; Hines és mtsai, 1987). A kérődző fajokban rendelkezésre álló igen nagy számú adathoz képest csak szerény ismeretekkel rendelkezünk arról, hogy kancákban az energetikai egyensúly, vagy annak esetleges hiánya mely élettani mechanizmusokon keresztül, és milyen mértékű befolyást gyakorolhat a petefészek-működés ciklikussá válására. Mivel a NEB előfordulása még az egyébként jelentősebb mennyiségű tejet termelő kancákban sem jellemző (Heidler és mtsai, 2002), ezért lovakban e kérdést eddig elsősorban az ovariális működés szezonális változásából elemezték (Nagy és mtsai, 2000; Gentry és mtsai, 2002ab; Guillaume és mtsai, 2002). A legutóbbi évek kutatási eredményei szerint az energiahányos állapotra a kanca, más emlősfajokhoz hasonlóan az inzulin, az IGF-I és a leptin szintjének csökkenésével, illetve a NEFA és a prolaktin koncentrációjának az emelkedésével reagál (Nadal és mtsai, 1997; Fitzgerald és McManus, 2000; McManus és Fitzgerald, 2000; Champion és mtsai, 2002). Feltételezik, hogy a világos órák melatonin-mediált hatása mellett e metabolikus faktoroknak (Fitzgerald és McManus, 2000; Gentry és mtsai, 2002a), illetve a HEL GnRH-val szembeni, az élettanitól elmaradó mértékű válaszkészségének (Gentry és mtsai, 2002b) is jelentőség tulajdonítható a biológiai tenyészszeton kezdetét jelző első ovulációnak az energiahányos takarmányozás esetén tapasztalt késlekedésében. Egy korábbi munkánkban magunk is kapcsolatot találtunk a biológiai tenyészszeton első ovulációjának az indukálhatósága és a HEL LH-raktárainak a telítettsége között (Nagy és mtsai, 1998c). A kanca HTH/HEL rendszere, illetve az FSH és a GnRH-mediált LH-elválasztás ugyanakkor korántsem olyan érzékeny a glukózellátás/metabolizmus átmeneti zavaraira (McManus és mtsai, 2002), mint az pl. kérődzőkben vagy laktáló kocában megszokott. Bár egyidejűleg a testsúly csökkenését, illetve NEB fölléptét nem tapasztalták, az ellés után — a kérődzőkben megszokott módon — lipicai kancákban is csökkent a plazma leptin szintje, miközben jelentősen emelkedett az AST és a γ -glutamil-transferase aktivitása (Heidler és mtsai, 2002). Semmi adatunk nincs azonban arról, hogy mindezek a tendenciák mutatnak-e valamiféle összefüggést az ellés utáni első ovuláció időpontjával. Úgyszintén ismeretlen, hogy a pajzsmirigy hormonok plazmaszintje, a tejhasznú tehénben tapasztalhatóhoz hasonló módon, kancákban is csökken-e a laktáció kezdetén.

A hőmérsékletnek valószínűleg nincs lényeges hatása a petefészek működésének ellés utáni alakulására: januárban ellett kancák esetén, a magas hőmérséklet (+27 °C) nem gátolta meg az első ovuláció késedelmes kialakulását, illetve a petefészek-működés leállását (Palmer és Driancourt, 1983).

Fedeztetés/termékenyítés a csikósárlás idején

Régóta vitatott kérdés, hogy a csikósárlás idején szabad-e a kancát fedeztetni, vagy sem. Egyes vélemények szerint az elléshez túl közeli, még az involúció időszakában történt fedeztetés utáni vemhesülés általában 10–20%-kal alacsonyabb, az embrióelhalás pedig több, mint a későbbi időpontban történt fedeztetés/termékenyítés után (Loy, 1980; Ginther, 1992). Különböző szerzők más-más (46–76%) vemhesülési arányt adnak meg a csikósárlás idején történt fedeztetések eredményességére (Du Plessis, 1964; Loy, 1980; Malschitzky és mtsai, 2002). Egy hazai felmérés szerint, a csikósárlás idején vemhesültek aránya kb. 46%, és az első 20 napon belül fedeztetett állatok vemhesülési aránya, az első fedeztetés után, szignifikánsan alacsonyabb, mint a 20. napon túl először fedeztetetteké (Jelenka, 1995). Újabb vizsgálatok szerint azonban nincs különbség a csikósárlás és a későbbi sárlások vemhesülési eredménye között, ha az első ovulációra az ellés utáni 10. napot követően kerül sor (Malschitzky és mtsai, 2002). Ez azzal magyarázható, hogy ebben az esetben az embrió a 14. nap után jut a méhbe, amikor az endometrium szövettani értelemben vett regenerációja nagyrészt már befejeződött (Ginther, 1992). A korábbi vizsgálatokban kapott alacsonyabb vemhesülési eredmények a felmérésbe vont kancák korával állhattak összefüggésben. Idősebb (10. év feletti) kancák esetén alacsonyabb a csikósárlás idején fedeztetettek vemhesülési aránya és több a korai embrióelhalás, mint fiatalabb állatokban (Woods és mtsai, 1987; Mattos és mtsai, 1995). Ha a kanca nem is vemhesül, a csikósárlás idején történő fedeztetés/termékenyítés nincs negatív hatással a kanca későbbi vemhesülésre, szaporodásbiológiai teljesítményére (Ginther, 1992). Ezért — hacsak azt az involúció szövődményei nem teszik lehetetlenné — a csikósárlás adta lehetőséget célszerű kihasználni és a kancát ebben az időben fedeztetni/termékenyíteni. A gyakorlatban többféle módszer is használatos a csikósárlás idején történő fedeztetések/termékenyítések eredményének javítására (összefoglalóan: Nagy és mtsai, 2003), az egyes kezelési eljárásokat azonban, terjedelmi okokból, ezúttal nem részletezzük.

A hivatkozott irodalom forrásai a szerzőnél megtalálhatók.
(The cited literature can be seen at the authors)

Szerző címe: Szent István Egyetem, Állatorvos-tudományi Kar
Author's address: Szent István University, Faculty of Veterinary Science
H-1400 Budapest, Pf. 2.

AZ AUTOMATIZÁLT SPERMAÉRTÉKELÉS FEJLESZTÉSI LEHETŐSÉGEI: FLOW CITOMETRIA

NAGY SZABOLCS

SUMMARY: NEW DIRECTIONS IN THE DEVELOPMENT OF AUTOMATIZED SEMEN QUALITY CONTROL: FLOW CYTOMETRY

Proper estimation of the quality of the processed semen is of crucial importance in bovine semen industry. Until now, microscopes were used to estimate semen quality; however, new, user-friendly flow cytometers now offer a powerful alternative.

Flow cytometers are applied to study sperm viability, acrosome integrity, chromatin stability, mitochondrial membrane potential, capacitation status and early membrane changes due to the freezing-thawing process and sperm concentration.

The main advantage of flow cytometry is the high speed and precision of measurements which can be done at cellular level. Multiparameter analyses can be done as well. Flow cytometers are widely used in basic and applied spermatology studies; moreover, the first experiences in their application in routine semen quality control at AI laboratories are promising.

A feldolgozott termékenyítő anyag minőségének pontos értékelése alapvető fontosságú feladat. A fertilitás előrejelzése, illetve a szub- vagy infertilitás diagnosztizálása, a spermaminőség-ellenőrzés fő feladatai továbbá a spermafeldolgozás egyes lépéseinek ellenőrzése az adott technológia gyenge pontjainak felismerésében segíthet. Napjainkig a minőség-ellenőrzés fő eszköze a mikroszkóp volt, azonban az új, felhasználóbarát flow citométerek megjelenése, egy új, az eddigiéknél jóval pontosabb alternatívát jelenthet.

A flow citometria lényege röviden a következő: a sejtek folyadékáramban egyesével haladnak keresztül a műszer mérőkamráján, ahol lézersugarat kereszteznek. A spermiumok által szórt fény a sejtek méretéről és belső összetettségéről ad információt, a lézer pedig a spermiumokhoz kötődő fluoreszcens festékeket gerjeszti. A citométerek bonyolultabb típusai képesek sejtszeparálásra (pl. spermaszexálásra), de léteznek olcsóbb, egyszerűbb, úgynevezett „asztali” modellek is, amelyek, ha az egyes sejtípusok szétválogatására nem is, de mérésére alkalmasak.

Flow citométer segítségével értékelhető az élő-elhalt ondósejtek aránya, az akroszómaintegritás, a kromatinállomány épsége, a mitokondriumok aktivitása, a kapacitációs állapot, illetve a mélyhűtés-felolvasztás hatására bekövetkező, ún. korai membránváltozások, valamint a spermiumkoncentráció is.

A flow citométerek alkalmazásának nagy előnye, hogy segítségükkel gyorsan, minden eddigi eljárásnál pontosabban tudunk sejtszintű vizsgálatokat végezni, akár több tulajdonság egyidejű értékelésével is. A műszereket ma már kiterjedten alkalmazzák spermatológiai alap- és alkalmazott kutatásokra, de szintén kedvezőek a rutinszerű tapasztalatok mesterséges termékenyítő állomásokon.

Szerző címe: Állattenyésztési és Takarmányozási Kutatóintézet
Author's address: Research Institute for Animal Breeding and Nutrition
H-2053 Herceghalom, Gesztenyés u. 1

KORAI VEMHESSÉG DIAGNOSZTIZÁLÁSA ELISA TESZT SEGÍTSÉGÉVEL SZARVASMARHÁBAN ÉS EGYÉB KÉRŐDZŐKBEN

SASSER, GARTH — GÁBOR GYÖRGY — TÓTH FRUZZSINA

SUMMARY: EARLY PREGNANCY DETECTION BY AN ELISA TEST IN CATTLE AND OTHER RUMINANTS

The Biopryn™ ELISA test has been developed for the determination of the Pregnancy-Specific Protein B (PSPB) in the blood samples of pregnant ruminants and looks useable on practical level for the determination of pregnancy in cattle and other ruminants. Biopryn® test is safe and easy to use in dairy practice 30 days after AI.

A vemhességi fehérjék kimutatásán alapuló laboratóriumi vizsgálatok (RIA, ELISA) a termékenyítés utáni 28–30. napon elvégezhetők. A gyakorlatban ma két (egymástól csak kissé különböző) vemhességi fehérje kimutatási módszer áll rendelkezésünkre a korai vemhesség vizsgálatára. Mindkét eljárás során a vemhes kérődzők vérszérumból mutatják ki a fehérjéket. Az egyik módszer, a vérszérumból egy vemhesség specifikus fehérje, az úgynevezett PAG (Pregnancy Associated Glycoprotein) kimutatása RIA eljárással, míg a másik a vemhesség specifikus B fehérje, a PSPB (Pregnancy Specific Protein B) kimutatásán alapuló ELISA eljárás. A vemhesség-specifikus protein A és B létezéséről először *Butler és mtsai* (1982) számoltak be. *Zoli és mtsai* (1991) újabb vemhességet jelző fehérjére bukkantak, ami PAG-1, majd később PAG-I-67 néven vonult be a köztudatba. A vemhesség megállapításán kívül, e fehérjék alkalmasak a placenta állapotának vizsgálatára, illetve az esetleges embrióvesztések előrejelzésére is. A két eljárás eredményességének összehasonlításakor szignifikáns eltérést nem tapasztaltak.

A vemhesség specifikus protein B (PSPB)

Ez egy a vemhes kérődző állatok vérszérumban található fehérje, melyet a trofoblaszt kétmagvú óriás sejtjei termelnek. Néhány primipara tehén vérszérumból már a gesztációt követő 15. napon kimutatható, de a legtöbb tehén vérszérumból csak a vemhesség 24–28. napján sikerült kimutatni. Tenyészet szinten, a vemhesség kimutatására, a vemhesülés utáni 28–30. napon használható. A vemhességre jellemző fehérjekoncentrációt (1–5 µg/ml) a gesztáció 24–28. napjára éri el, mely koncentráció a vemhesség egész ideje alatt közel állandó szinten marad. A vemhesség kimutatására egy dupla antitest radioimmunoassay (RIA) módszert fejlesztettek ki, majd az elmúlt években a vemhesség specifikus protein B kimutatására alkalmas Biopryn® ELISA (BioTracking LLC, Moscow, ID, USA) módszer is kifejlesztésre került. A PSPB az ellés után is viszonylag hosszú ideig megmarad a keringésben, felezési ideje több mint két nap, és a vérből csak 80–100 nappal az ellés után tűnik el teljesen. Ez az oka annak, hogy egy új vemhesség kimutatása a vérből, az ellés

után, könnyen adhat tévesen pozitív eredményt, ha a termékenyítés az előző ellés utáni 60. napon belül történt, a vemhesség vizsgálat, pedig már a termékenyítéstől számított 30. napon belül megtörténik. Másodszor is vemhes tehenekben, az ellést követő 80. napon, négyszer magasabb PSPB szintet mutattak ki a keringésben, mint a nem vemhes tehenekben, ugyanennyi idővel az ellés után. A tesztet tehát csak a gesztációs periódus 28. napjától lehet használni, ami a gyakorlatban annyit jelent, hogy az előző elléstől számítva már legalább 90 napnak el kell telnie. A teszt segítségével a termékenyítést követő 30 nappal az üresen maradt tehenek 100%-os biztonsággal kiszűrhetők.

Szerzők címe: Sasser, G.: University of Idaho, Moscow, ID, USA,
Authors address: Gábor, Gy. – Tóth, F.: Állattenyésztési és Takarmányozási Kutatóintézet
Research Institute for Animal Breeding and Nutrition
H-2053 Herceghalom, Gesztenyés u. 1.

A JUHOK INTRAUTERIN TERMÉKENYÍTÉSÉNEK EREDMÉNYESSÉGÉT BEFOLYÁSOLÓ TÉNYEZŐK

MAGYAR KÁROLY

SUMMARY: FACTORS INFLUENCING FERTILITY AFTER INTRAUTERINE ARTIFICIAL INSEMINATION (A.I.) OF SHEEP

There are a number of factors which may influence the results of fertility. The author summarised these from a practical point-of-view: biological condition of the flock, season, circumstances of synchronisation, time of insemination, dose and quality of semen, technical details of intrauterine A.I. The success of an AI program depends on these fundamental factors in practice.

Az állomány biológiai állapota:

Életkor: 3–5. éves anyák szinkronizálási eredményei a legjobbak, túl fiatal (7–8. hónapos), illetve öreg (6–10. éves) anyák nehezebben vemhesíthetők;

Takarmányozás: mikro- és makroelemek hiánya, fehérje-hiány szubklinikai ketózis, stb. mind hátrányosan befolyásolják a termékenyítés eredményeit;

Elléstől eltelt idő: a bárányok korai leválasztását (60. nap) követő ellés eredménye rosszabb eredményeket ad; előző elléskor nagyobb almot nevelő anyák vemhesülése és szaporasága gyengébb;

Nyírás, fűrésztés, a gyógyszeres kezelések kerülendők a termékenyítést megelőzően, majd azt követően 6 hétig, (korai embrió elhalás arányát növelik);

Szezon: szezonban (ősszel, augusztus vége-november vége) jobbak a termékenyítési eredmények, szezonon kívül (tél, tavasz, nyár) nehezebben szinkronizálható az ivarzás, rosszabb a vemhesülés;

A szinkronizálás körülményei: (FGA, MAP, PMSG adag) FGA (Chrono-gest tampon); CIDR: előnyösebb (természetes progeszteron) (szezonban 40 mg-os PMSG → 400–500 NE, szezonon kívül 30 mg-os → 600–750 NE), emellett szezonon kívül a vasectomizált kos hatása pozitív;

Az inszeminálás ideje: 60–66. óra (Cervicalis inszeminálásnál 48–58. óra), szuperoovuláltatásnál → friss sperma 36–48. óra, mélyhűtött sperma 44–48. óra.

Az inszeminálás technikai részletei:

— előkészítés: 24 óra szomjaztatás és éheztetés, kisebb a kockázat, gyorsabb az inszeminálás;

— egyszeri antibiotikum vagy szulfonamid kezelés im.

— inszemináló pipetta;

— stressz tényezők csökkentése → kíméletes bánásmód, 12 órás pihentetés (korai embrióvesztés mérséklése).

Az ondó minősége, termékenyítő adag → 20 millió élő sejt elegendő.

Szerző címe: Debreceni Egyetem, Agrártudományi Centrum
Author's address: Debrecen University, Centre for Agricultural Sciences
H-4032 Debrecen, Böszörményi u. 138.

SERTÉS EMBRIÓK MÉLYHÚTÉSÉNEK LEHETŐSÉGEI

BALI PAPP ÁGNES — VARGA ERIKA — KISS VERONIKA

SUMMARY: POSSIBILITIES OF PIG EMBRYO FREEZING

This century is the century of biology: there is a huge development in the area of gene technology, gene mapping and *in vitro* techniques. The apply of results of biotechnological research is indispensable for the up to date animal breeding. Genetic development becomes easier by the help of biotechnology, than applying traditional animal breeding methods.

Deep freezing of pig gametes and embryos is still an interesting research area. Pig gametes and embryos are more sensible for deep freezing injuries than other livestock animals. Pig cytoplasm has a lot of lipid drops, therefore the cytoplasm is more sensible for cryopreservation. The usage of conventional freezing methods leads to low efficiency. Better results can be achieved by the application of vitrification methods in pig embryo cryopreservation. The fastest freezing rate is 2,500 °C/min in case of the use traditional straw volume (250 µl), while it is 24,000 °C/min in case of OPS method. This guarantees very fast passage for the embryo through the critical temperature zone and decreasing of freezing injuries.

The aim of the study is to develop new vitrification methods for morula and blastocysts embryos of different types of pigs with special attention to the important (Hungarian Large White) or native (Swallow-bellied Mangalica) pig breeds of Hungary.

Századunk a biológia százada, ugrásszerű fejlődés figyelhető meg a géntechnológia, géntérképezés és különböző *in vitro* technikák alkalmazásában. A korszerű állattenyésztés nem nélkülözheti a biotechnológiai kutatások eredményeinek alkalmazását, mellyel a kívánt irányban történő genetikai előrehaladás könnyebben megvalósítható, mint a hagyományos tenyésztési módszerekkel.

Az embrió mélyhűtés jelentősége abban van, hogy az embrió előállításától és időtől teljesen függetlenné válik. A nagy genetikai értéket képviselő vagy veszélyeztetett fajok genetikai anyagának tárolása megfelelő mélyhűtési technikák alkalmazásával megoldható, így a genetikai előrehaladás meggyorsítható. A nemi úton terjedő betegségek elkerülhetők, és a nagy, kontinensekre kiterjedő járványok idején (pl. száj és körömfájás) a tenyészállat export-import megvalósításának egyetlen eszköze a mélyhűtött embriók kereskedelme.

A sertés fajban az ivarsejtek és embriók hűtése a mai napig érdekes kutatási terület, mert a sertés ivarsejtjei és embriói sokkal érzékenyebbek a hűtés során fellépő károsító hatásokra (mivel citoplazmájukban rendkívül sok lipid csepp található, és ezáltal fokozottabban érzékeny a +4 °C alá hűtésre), mint egyéb gazdasági állatoké. A hagyományos hűtési módszerek csak nagyon rossz hatásfokkal használhatók. A sertésembrió hűtésében, a vitrifikációs technikák, ezen belül is az OPS technika alkalmazásának eredményei, az elmúlt egy-két évben jelentősen javultak. A vitrifikáció egy viszonylag új hűtési eljárás, mindössze 20 éves múltra tekinthet vissza. A módszer alkalmazása teljesen kiküszöböli a jégkristály képződés problémáját, az embriót nagy töménységű krioprotektánsokkal ekvilibráltatják, majd azonnal folyékony nitrogénbe helyezik. A hagyományos 250 µl-es inszeminációs műszalma alkalmazásakor, a leggyorsabb hűtési arány, 2500 °C/perc, az OPS vitrifikációnál pedig 24 000 °C/perc,

ami lehetővé teszi az embrió számára, hogy bizonyos kritikus hőmérsékleti zónákon nagyon gyorsan haladjon át, és csökkenjen a hűtési károsodás.

A kutatás célja, hogy eredményes vitrifikációs módszereket fejlesszünk ki a különböző fajtájú sertés morula és blasztociszta embriók mélyhűtésére, különös tekintettel a Magyarországon gazdasági szempontból jelentős és őshonos fajták petesejtjeinek és embrióinak hűtésére (pl. magyar nagy fehér, fecskehasú mangalica, stb). Első lépésben az *in vivo* nyert embriók hűtését végezzük különböző vitrifikációs közegekben, a megfelelő vitrifikációs és visszaolvasztási módszer megkeresésére, az embriók visszaolvasztás utáni kultiválásának és embriófejlődésének ellenőrzésével, a hatching (kibújt blasztociszta) utáni állapot észlelésének követésével. A kísérleteket *Françoise Berthelot* (INRA, Tours, Franciaország) kutatócsoportjával együttműködésben kezdtük meg. A megfelelő vitrifikációs módszerek kialakítása után, a vitrifikált visszaolvasztott embriók laparoszkópos beültetését a megfelelően előkészített recipiensekbe, a vemhességek követése, és az utódok számának ellenőrzése fogja követni. Az *in vitro* és *in vivo* összehasonlító kísérleteket, a laparoszkópos beültetéseket társintézményünkkel, az Állattenyésztési és Takarmányozási Kutatóintézet (Herceghalom) közösen végezzük.

Szerzők címe: Nyugat-Magyarországi Egyetem, Állattenyésztési Intézet
Authors' address: University of West Hungary, Institute of Animal Breeding
H-9200 Mosonmagyaróvár, Vár u. 2.

BIOPSZIÁLT EGÉR ÉS SZARVASMARHA EMBRIÓK VITRIFIKÁLÁSA MIKROCSEPP TECHNIKÁVAL*

BARANYAI BENCE — GÓCZA ELEN — BODÓ SZILÁRD

SUMMARY: VITRIFICATION OF BIOPSIED MOUSE AND BOVINE EMBRYOS WITH A MICRO-DROP TECHNIQUE

Cryosurvival of biopsied 8-cell mouse and bovine embryos was evaluated following vitrification with a method called Solid Surface Vitrification (*Dinnyés et al.*, 2000). Following a two-step equilibration in 4% ethylene glycol and a mixture of 35% ethylene glycol, 5% polyvinyl-pyrrolidone and 0.4 M trehalose, embryos were expelled on a nitrogen-cooled metal surface in a 1-2 μ l microdrop. Mouse and bovine embryos were warmed in 0.3 M trehalose at 37 °C and 39 °C, respectively.

Development of vitrified and biopsied mouse embryos was 98% (39/40), not different from vitrified intact embryos (97%, 31/32). Birth rate following transfer was 66% (25/38) and 76% (34/45), respectively. 72% (54/75) of the biopsied embryos and 82% (37/45) of intact embryos reached blastocyst stage following vitrification.

No significant differences were detected between respective values of control and biopsied mouse and bovine embryos. The microdrop method is a reliable method to vitrify biopsied mouse and bovine embryos.

Az *in vitro* vagy *in vivo* előállított embriók beültetés előtti ivar-meghatározása vagy egy kívánatos tulajdonságra, esetleg öröklődő rendellenességre történő szűrése, a molekuláris módszerek fejlődésével egyre inkább lehetővé válik. A Preimplantációs Genetikai Diagnózis, az embrióból biopsziával eltávolított sejtből (blasztomerből) vagy sejtek csoportjából, molekuláris módszerekkel végezhető. Ha a biopszia és az embrió beültetése között hosszabb idő telik el, vagy nincs felhasználható recipiens, indokolt a biopsziált embrió mélyhűtése. Kísérleteinkben a biopsziázott embriók mikrocsepp technikával végzett vitrifikációját értékeltük.

8-sejtes *in vivo* eredetű egér, és 8-16-sejtes *in vitro* előállított szarvasmarha embriókat biopsziáltunk *Bodó és mtsai* (2002) módszere szerint, majd az embriókat *Dinnyés és mtsai* (2000) által kidolgozott eljárás szerint vitrifikáltuk. A vitrifikáció során használt oldatok alapja minden esetben 20% magzati borjúszérummal (Fetal Calf Serum, FCS; Gibco) kiegészített TCM-199 (Sigma) volt. Az eljárás során az embriókat, etilén-glikol (EG) 4%-os oldatában 39 °C-on 15 percig, majd 35% EG-t, 5% polyvinyl-pyrrolidont és 0,4 M trehalózt tartalmazó oldatban 30 másodpercig ekvilibráltuk. Az embriókat tartalmazó 1-2 μ l-es cseppeket folyékony nitrogénben hűtött fémfelületre ejtve vitrifikáltuk. Felolvasztásuk és a védőanyag embriókból történő kivonása 39 °C-os 0,3 M trehalózban történt. Alapoldatban végzett mosást követően, az embriókat, *in vitro* kultiváltuk ill. egér esetében recipiensbe ültettük.

Felolvasztást követően a kontroll egérembriók 97%-a (31/32), a biopsziáltak 98%-a (39/40) jutott el a kikelt blasztociszta stádiumba. A beültetett kontroll embriók születési aránya 76% (34/45), míg a biopsziáltaké 66% (25/38) volt. A vitrifikált szarvasmarha-embriókból kikelt blasztociszták aránya a kontroll eseté-

* A munka költségeit az NKFP 4/031/2001 és az FVM 57017/2001 sz. pályázat finanszírozta

ben 82% (37/45), míg a biopsziáltak esetében 72% (54/75) volt. A biopsziált és a kontroll embriók fejlődési ill. születési eredményei között nem volt szignifikáns különbség. Ennek alapján megállapítható, hogy a mikrocseppes módszer mindkét faj intakt és biopsziált embrióinak vitrifikálására alkalmas.

IRODALOM

- Bodó, Sz. – Laczkó, L. – Horváth, G. – Baranyai, B. –, Szabó, M.H. – Dohy, J. – Gócza, E.*(2002): A simplified biopsy method for precompacted mouse embryos: a technical report. *Acta Vet. Hung.*, 50. 4. 469–479.
- Dinnyes, A. – Dai, Y. – Jiang, S. – Yang, X.*(2000): High developmental rates of vitrified bovine oocytes following parthenogenetic activation, in vitro fertilization, and somatic cell nuclear transfer. *Biol. Reprod.*, 63. 2. 513-518.

Szerzők címe. Mezőgazdasági Biotechnológiai Kutatóközpont, Állatbiológiai Intézet
Authors' address: Agricultural Biotechnology Centre, Institute of Animal Biology
H-2100 Gödöllő, Szent-Györgyi A. u. 4.

ÚJABB *IN VITRO* MÓDSZEREK HASZNÁLATA BAROMFIONDÓSEJTEK MÉLYHÜTÉST KÖVETŐ TERMÉKENYÍTŐKÉPESSÉGÉNEK VIZSGÁLATÁRA

VARGA ÁKOS — VÉGI BARBARA — LIPTÓI KRISZTINA — BARNA JUDIT

SUMMARY: NEW METHODS FOR THE EVALUATION OF THE FERTILIZING ABILITY OF FROZEN/THAWED POULTRY SPERMATOZOA

The method of OPVL sperm (sperm in the outer perivitelline layer of laid eggs) counting and *in vitro* spermatozoa-egg interaction assay seem to be suitable tools for the more precise evaluation of the fertilizing ability of poultry semen after cryopreservation.

For the evaluation of the fertilizing ability of frozen/thawed semen, a knowledge of the correlation between the OPVL sperm number and the fertility of the eggs is necessary. This correlations were determined in turkey, chicken and goose earlier. According to our examinations on duck, eggs containing >0.5 OPVL sp/mm² were found to be fertile and those which contained <0.05 sp/mm² were infertile.

The decline in the sperm quality of cryopreserved fowl semen after thawing and removing the glycerol by centrifugation proved to be three times higher — determined by *in vitro* sperm-egg interaction assay — than that of determined by aniline-eosine staining method.

Jóllehet a hímivarsejtek fagyasztására irányuló első sikeres kísérlet házi-tyúk kakas spermiumaival történt (*Polge*, 1951), a madárspermiumok fagyasztásának hatékonysága mégis elmarad a legtöbb haszonállatként tartott emlősétől. Bizonyos számítások szerint, a fagyasztott sperma termékenyítőképessége csupán 1,6%-a a fagyasztás előttinek, annak ellenére, hogy *in vitro* tesztekben a fagyasztott és felolvasztott hímivarsejtek életképességét 8,5 és 68% között találták (*Wishart*, 1985). Az emlősökhöz viszonyított gyenge eredmény oka egyrészt a madarak hímivarsejtjeinek eltérő membránszerkezetében, másrészt a madarak petevezetőjének anatómiai és élettani sajátosságáiban keresendő. A legtöbb módszert a hímivarsejtek fagyasztására, a baromfifajok közül, a házi-tyúkra fejlesztették ki. *Seigneurin és Blesbois* (1995), *Schramm* (1991) és *Tselutin és mtsai* (1995) eltérő módszereinek összehasonlításakor, a felolvasztott ondómintában a hímivarsejtek 32–46%-a bizonyult élőknek, és 3–4 naponta megfelelő számú spermium inszeminálásakor, a tojások 76–88%-a volt termékeny (*Chalah és mtsai*, 1999). Gúnarak hímivarsejtjeinek mélyhűtésére az elmúlt években több, a házi-tyúk esetében tapasztalhatóhoz hasonló, hatékony fagyasztási eljárást dolgoztak ki (*Tselutin és mtsai*, 1995; *Lukaszewicz*, 2001). Pulyka hímivarsejtek esetében is többféle krioprotektánsal próbálkoztak, de a fertilitási eredmények legtöbb esetben elmaradnak a házi-tyúkéétől (*Schramm*, 1986; *Tselutin és mtsai*, 1995). A különböző kutatócsoportok által kifejlesztett mélyhűtési eljárások eredményei nem hasonlíthatók össze objektíven. A „termékenységi index” függ az inszeminálás gyakoriságától, mélységétől, az inszeminált spermiumszámtól, a használt tojótyúkok fajtájától és élettani állapotától, sőt a termékeny tojások eltérő megítélésétől is. A gyakorlatban használt élő-holt festések és más membránintegrációs vizsgálatok eredményei friss on-

dó esetén igen, hosszabb ideig tárolt vagy mélyhűtött-felengedett ondóminták esetében nem korrelál megfelelőképpen annak termékenyítőképességével.

A Kisállattenyésztési és Takarmányozási Kutatóintézet (KÁTKI) Baromfi Szaporodásbiológiai Osztályán, a tárolt baromfiondósejtek termékenyítőképességének vizsgálatára, a korábbiaknál alkalmasabbnak tűnő membránvizsgálati módszerek fejlesztésére, tesztelésére és különböző baromfifajokhoz történő adaptálására végzünk kísérleteket.

A kérdéses ondóminták inszeminálása után, a termékenyített tojások szikahártyájának rétegei közé „*in vivo*” záródott spermiumokat (OPVL spermiumok) DNS specifikus fluoreszcensz festékekkel tesszük láthatóvá. Ezek számának meghatározásával, a petesejt megtermékenyítésének a helyén és idején lévő hímivarsejtek koncentrációja becsülhető meg. Az OPVL spermiumszám és a spermiumok termékenyítőképessége közötti szoros kapcsolatot már többen kimutatták, ami az eddig használatos termékenységi és *in vitro* teszteknel informatívabb, pontosabb eredményt ad. Az OPVL spermiumok számolásával végzett fertilitásbecslést és a fertilis periódus hosszának előrejelzését pulykán és házityúkon (Wishart, 1997), majd házilúdon (Barna és mtsai, 2000) már kidolgozták, és hasonló vizsgálatainkról házikacsatojásokon, pedig jelen előadásunkban számolunk be. Kísérletünkben 0,5 OPVL spermium/mm² érték felett a tojások termékenyek voltak, és 0,05 OPVL spermium/mm² érték alatt nem találtunk termékeny tojást.

Az *in vitro* membránteszt során, a tojás belső perivitellin membránjával együtt inkubáljuk a spermiumokat, majd a spermiumok által hidrolizált lyukakat megszámlálva minősítjük a spermamintát (Robertson és Wishart, 1997). Ezzel a spermiumok több funkcióját teszteljük egyszerre: meghatároztuk az élő, az ép morfológiájú, a motilis, és a akroszóma-reakcióra, illetve penetrációra képes sejtek arányát. Kísérletünkben glicerinnel mélyhűtött, majd felengedett spermaminták életképességét vizsgáltuk anilin-eozin festéssel, és az *in vitro* membrántesztel, a glicerinnel eltávolítása előtt és a centrifugálás után. A membránteszt minden esetben jelentős, a centrifugálás előtti értékhez képest átlagosan 65%-os értékcsökkenést mutatott a spermiumok minőségében. Ezzel szemben az anilin-eozin festéssel kimutatható élő normális sejtek aránya esetenként nem, máskor csak kisebb mértékben csökkent (átlagosan 21%-kal). Kísérletünk megerősíti azokat a megfigyeléseket, amelyek szerint a többfunkciós membránteszt — tárolt ondóminták esetén — érzékenyebbnek mondható a hagyományos egyfunkciós *in vitro* teszteknel. Egyszerűsége és érzékenysége folytán kiválóan alkalmas a spermiumok mélyhűtési eljárásainak, illetve az eljárás egyes lépéseinek összehasonlítására.

IRODALOM

- Barna, J. – Do thi Dong Xuan, K. – Szalay, I. (2000): Preliminary study on the *in vivo* sperm transport in goose. Proc. 14th Int. Cong. Anim. Reprod., Stockholm, 1. 114.
- Chalah, T. – Seigneurin, F. – Blesbois, E. - Brillard, J.P.(1999): *In vitro* comparison of fowl sperm viability in ejaculates frozen by three different techniques and relationship with subsequent fertility *in vivo*. Cryobiology, 39. 185–191.
- Lukaszewicz, E.(2001): DMF effects on frozen gander semen. Br. Poult. Sci., 42. 308–314.
- Polge, C.(1951): Functional survival of fowl spermatozoa after freezing at -70 °C. Nature. 167. 949–950.

- Robertson, L. – Wishart, G.J.*(1997): *In vitro* sperm-egg interaction assay using inner perivitelline layer from laid eggs. *Bakst, M.R. – Cecil, H.C.*(ed.) In: Techniques in fertility evaluation and the collection, storage and insemination of poultry semen. Poultry Sci. Association, Savoy, Illinois, 64–67.
- Schramm, G.P.*(1986): Flüssig- und Gefrierkonservierung von Putensperma. *Mh. Vetmed.*, 41. 460–463.
- Schramm, G.P.*(1991): Eignung verschiedener Gefrierschutzstoffe zur Kryoprotektion von Hahnensperma. *Monatsh. Veterinärmed.*, 46. 12. 438–440.
- Seigneurin, F. – Blesbois, E.*(1995): Effects of the freezing rate on viability and fertility of frozen-thawed fowl spermatozoa. *Theriogenol.* 43. 1351–1358.
- Tselutin, K. – Narubina, L. – Mavrodina, D. – Tur, B.*(1995): Cryopreservation of poultry semen. *Br. Poultry Sci.*, 36. 805–811.
- Wishart, G.J.*(1985) Quantitation of fertilizing ability of fresh compared with frozen and thawed fowl spermatozoa. *Br. Poultry Sci.*, 26. 375–380.
- Wishart, G.J.*(1997): Quantitative aspects of sperm:egg interaction in chickens and turkeys. *Anim. Reprod. Sci.*, 48. 81–92.

Szerzők címe: Kisállattenyésztési és Takarmányozási Kutatóintézet,
Authors' address: Baromfi Szaporodásbiológiai Osztály
Institute for Small Animal Research, Dept. of Poultry Reproduction
H-2100 Gödöllő, Pf. 417.

IVARSEJT KIMÉRA NYULAK LÉTREHOZÁSA MIKROINJEKTÁLÁSOS MÓDSZERREL

BODROGI LILLA — BODÓ SZILÁRD — GÓCZA ELEN — CARSTEA, BOGDAN —
HIRIPI LÁSZLÓ — RÉVAY TAMÁS — KOVÁCS ANDRÁS — BŐSZE ZSUZSANNA

SUMMARY: PRODUCTION OF GERMLINE CHIMERA RABBITS BY MICROINJECTION

The production of transgenic mice and rabbits by pronuclear microinjection has been successfully adapted at ABC, Gödöllő for a decade. However, targeted gene modification cannot be achieved by this method. Manipulation of embryonic stem cells or somatic cells is a good alternative. Manipulated and pre-selected stem cells or somatic cells as a source for nuclear transfer or manipulated stem cells can be used to produce germline chimeras.

Isolation of blastomeres of human VIII. factor transgenic embryos followed by blastomere microinjection into pre-compacted morula allowed us to create 4 chimera rabbits, two of which are germline chimeras. Human VIII factor gene was used as a molecular marker for the detection of chimerism and also to quantitatively analyse multiple organs of the chimeras. Our future aim is to produce transgenic rabbits carrying targeted gene modifications by the help of this successfully adapted and improved method.

BEVEZETÉS

Intézetünkben már évek óta folyik transzgénikus nyúl, illetve egér előállítás az úgynevezett előmag mikroinjektálásos módszerrel. Ez a módszer azonban nem teszi lehetővé az idegen eredetű genetikai információ irányított bevitelét. A módszer alternatívája embrionális őssejtek vagy testi sejtek genetikai manipulációja. A manipulált és előszelektált sejtekből ezt követően sejtmagtranszferrel (*Matsuda és mtsai, 2002*), vagy embrionális őssejtekből kiindulva, kiméra állatok előállításával (*Schoonjans és mtsai, 1996*) van lehetőség transzgénikus egyedek előállítására.

ANYAG ÉS MÓDSZER

Vizsgálataink során a kiméra előállításához egy vad típusú nőstény és a humán VIII. véralvadási faktorra homozigóta transzgénikus bak (*Hiripi és mtsai, 2003*) pároztatásából nyert nyolcsejtes, kompaktálódás előtti morula egyetlen blastomerjét juttattuk be mikroinjektálással egy vad típusú 10-16 sejtes morula perivitellinális terébe. A VIII. véralvadási faktort (transzgén), mint markergént alkalmaztuk a blastomer sorsának követésére, a kimérizmus detektálására és mennyiségi meghatározásra. Az ily módon előállított kiméra embriókat laparoszkópiás eljárással ültettük vissza hormonálisan előkezelt recipiens nyulakba.

A megszületett utódok tesztelése PCR-rel történt. A transzgén tekintetében pozitív PCR eredmények alapján elkülönített kimérákat ezután kromoszóma analízisnek vetettük alá az állatok kromoszómális nemének a meghatározásához (*Révay és mtsai, 2002*). A kimérákat természetes úton párosítottuk vad típusú állatokkal és a született utódokat szintén PCR-rel teszteltük az ivarsejt-

kimériszmus igazolására. Az állatok leölése után a különböző szervekből vett mintákon, PCR-rel vizsgáltuk a markergén jelenlétét. A PCR-rel pozitívnak ítélt szervekből pedig real time PCR-rel következtettünk a kiméra sejtek arányára az adott szervben.

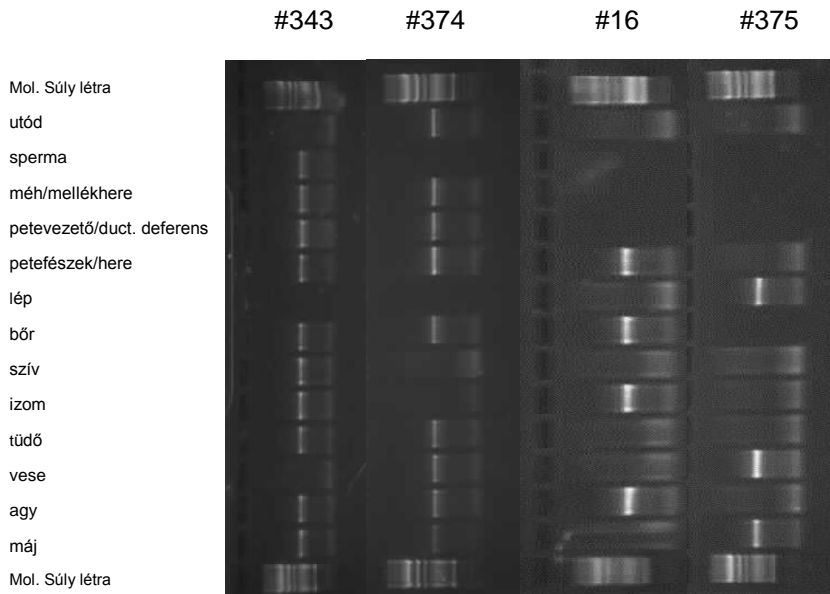
EREDMÉNYEK

Összesen 87 embrió mikroinjektálása történt meg, ezek 32 százaléka született élve. Ez hasonló a nem injektált embriók születési arányához (34%), ami azt jelenti, hogy a mikroinjektálással történő manipuláció, adataink szerint, nem rontja az embriók születési esélyeit. Az élve született állatok közül a PCR eredmények alapján négy kiméra volt (kiméra állatok kódja: 16, 334, 374, 375.).

A kimérák közül kettő nősténynek (16, 374) egy hímnak (334) bizonyult, illetve egy interszexuális egyed (375) volt a kromoszóma vizsgálat alapján. A 16. nőstény elpusztult egy bakteriális fertőzés következményeként, anélkül, hogy élő utódai születtek volna. Öt magzatot találtunk benne, amelyek mindegyike negatív volt a markergénre. A 375. interszexuális állat utódai között nem találtunk olyan egyedet, amely hordozta volna a markergént. A két nem ivarsejt kiméra (375, 16) szöveteinek vizsgálatát elvégeztük PCR-rel. Ezek alapján a 375. egyed vizsgált szöveteinek a 33 százalékában lehetett kimutatni a markergént, míg a 16. állat szöveteinek 44 százalékában hordozta azt (1. ábra).

1. ábra

A humán VIII. faktor, markergén detektálása PCR-rel a kiméra állatok szöveteiben



1. táblázat

Az ivarsejt kiméra állatok (374. nőtény és 334. hím) hagyományos PCR-rel pozitívnak bizonyult szöveteinek real time PCR-rel történő elemzése a transzgént hordozó sejtek arányának (tr/n%) meghatározására

	PCR	Nőtény	PRC	Hím
Vese	+	50,13	—	—
Tüdő	+	25,06	—	30,20
Agy	+	17,26	+	1,45
Bőr	+	12,43	+	1,82
Máj	+	7,17	+	0,10
Izom	—	—	+	0,39
Petefészek	+	3,64	—	—
Sperma	—	—	+	1,21
Méh	+	4,31	—	—
Mellékhere	—	—	+	15,61
Petevezető	+	4,22	—	—
Ondóvezeték	—	—	+	0,71
Here	—	—	+	0,37

A hímek spermáját is teszteltük, a 334-es hím pozitívnak bizonyult a markergénre. Összesen 26 utódja született, amelyek közül egy sem volt pozitív. Real time PCR-rel kapott eredmények alapján, ennél a hímnél a sperma 1,2 százaléka hordozta a markergént, tehát elképzelhető, hogy a született utódok alacsony száma miatt nem találtunk markergént hordozó utódot. A 374. nőtény kevés számú utódja (20) közül egy transzgénikusnak bizonyult. Tehát a 374. nőtény ivarsejt kiméra, a petefészek sejtjeinek 3,64 százaléka tartalmazta a transzgént (1. táblázat).

A 374-es nőtény és a 334-es hím szerveinek real time PCR-rel való vizsgálata alapján igen eltérő a transzgént hordozó sejtek reprezentáltsága a különböző szervekben. A 374-es nőtény esetében a legnagyobb százalékban a vese volt transzgénikus (50,13%), szemben a 334-es hímmel, akinek a veséje nem hordozta a transzgént. Mindkét állat esetében a tüdőben igen magas volt a transzgént hordozó sejtek aránya (25 illetve 30,2%).

A jelenleg rendelkezésre álló technikai eszközök segítségével intézetünkben két ivarsejtkiméra nyúl előállítására történt meg, amelyek különböző szövetekben a kimérizmus fokát kvantitatívan is meghatároztuk. Ezek az eredmények képezik alapját azoknak a jövőbeli kutatásainknak, amelyek során kiméra állat előállításával irányított génbevitellel transzgénikus vonalakat hozunk létre. Ez lehetővé teszi különböző fiziológiás és patológias folyamatok tanulmányozását, illetve rekombináns fehérjék termeltetését transzgénikus nyúl tejében.

IRODALOM

- Hiripi, L. – Makovics, F. – Baranyi, M. – Halter, R. – Paul, D. – Carnwath, JW. – Bősze, Zs. – Niemann, H.(2003): Expression of active human blood clotting factor VIII in mammary gland of transgenic rabbits. DNA Cell Biol., 22. 41–45.
- Matsuda, J. – Takahashi, S. – Ohkoshi, K. – Kaminaka, K. – Kaminaka, S. – Nozaki, C. – Maeda, H. – Tokunaga, T.(2002): Production of transgenic chimera rabbit fetuses using somatic cell nuclear transfer. Cloning and Stem Cells., 4. 1. 9–19.

- Révay, T. – Kovács, A. – Rens, W. – Gustavsson, I.*(2002): Simultaneous detection of viability and sex of bovine spermatozoa. *Reprod. Fertil. Dev.*, 14. 373–376.
- Schoonjans, L. – Albright, GM. – Li, J. – Collen, D. — Moreadith, RW.*(1996): Pluripotential rabbit embryonic stem (ES) cells are capable of forming overt coat color chimeras following injection into blastocysts. *Mol. Repr. and Development*, 45. 439–443.

Szerzők címe: Bodrogi, L. – Bodó, Sz. – Gócza, E. – Carstea, B. – Hiripi, L. – Bősze, Zs.:

Authors' address: Mezőgazdasági Biotechnológiai Kutatóközpont
Agricultural Biotechnology Center (ABC), Department of Animal Biology
H-2100 Gödöllő, Szent-Györgyi Albert út 4.

Révay, T.: Kisállattenyésztési és Takarmányozási Kutatóintézet
Institute for Small Animal Research
H-2100 Gödöllő, Pf. 417.

Kovács, A.: Állattenyésztési és Takarmányozási Kutatóintézet
Research Institute for Animal Breeding and Nutrition
H-2053 Herceghalom, Gesztenyés u. 1.

EMBRIÓMANIPULÁCIÓ PÁVIÁNOKON ÉS EGYÉB FAJOKON

CSEH SÁNDOR — KONC JÁNOS — KANYÓ KATALIN

SUMMARY: EMBRYO MANIPULATION IN THE BABOON AND OTHER SPECIES

Most technical aspects of the reproductive manipulation of humans and animals are very similar, but the reasons for using them are obviously very different. Many components of successful human ART used today have been derived from animal studies. The animal experiments can provide very useful information and practical experiences that can be directly transferred to human, especially in those fields where ethical and legal questions are raised by the use of human materials for research purposes (e.g. every form of embryo manipulation). The results and experiences obtained in two fields of assisted reproduction, namely 1) ovarian stimulation and ultrasound guided follicular aspiration in baboon, and the 2) recently-developed spindle view (SV) technique are described and the relevance of them to human IVF is considered briefly.

Az állatkísérletek fontos szerepet töltenek be az emberben és az állatokban alkalmazott asszisztált reprodukciós eljárások/technikák (ART) kifejlesztésében. Technikailag az ember és az állatok reprodukciójának manipulálása nagyon hasonlít egymáshoz. Az emberben sikeresen alkalmazott ART nagy része állat kísérletek eredményeképpen került bevezetésre.

Az osztódási orsó vizsgálatának céljai voltak:

1. Tapasztalatok szerzése az osztódási orsónak az ún. „spindle view”, (polarizációs mikroszkópos; LC-Polscope) technikával történő vizsgálatával, a humán petesejtek minőségének bírálata során, a klinikai *in vitro* fertilizációban (IVF).
2. Tanulmányoztuk a hőmérséklet-csökkenés hatását az osztódási orsó szerkezetére és kimutathatóságára egér petesejteken, valamint
3. vizsgáltuk, hogy a folliculus punkció után, közvetlenül az intra citoplazmatikus spermium injektálás (ICSI) előtt végzett „spindle view” vizsgálat — az osztódási orsó helyzetének a meghatározása révén — előnyös-e az ICSI szempontjából.

A vizsgált 171 petesejtből 124-ben detektáltuk az osztódási orsót (124/171; 72,5%). A 124 MII stádiumú humán petesejtben meghatározva az osztódási orsó helyét azt tapasztaltuk, hogy a petesejtek 62%-ában (77/124) az osztódási orsó 6 vagy 12 óra, 25%-ában (31/124) 3 vagy 9 óra irányában helyezkedett el, míg 10,5%-ában (13/124) a sarki testben detektáltuk. Az esetek 2,5%-ában (3/124) a petesejt nem rendelkezett sarki testtel, de az osztódási orsót kimutattuk. A vizsgált petesejtek csoportjában 71%-os (122/171) termékenyülést figyeltünk meg, ami nem különbözik a kontroll, nem vizsgált petesejtek megtermékenyülési arányától (66%, 62/94, $P > 0,7$). Eredményeink azt mutatják, hogy az osztódási orsó detektálásával kapcsolatos polarizációs mikroszkópos vizsgálat nem befolyásolta hátrányosan a petesejtek termékenyülését és továbbfejlődését.

Megfigyeléseink szerint, az optimálisnál alacsonyabb hőmérséklet, változást indukált az orsó szerkezetében. Közvetlenül a kezelés után, az egér petesejtek 80%-ában mutattuk ki az osztódási orsót (16/20), ami nem különbözik a kontroll csoportban tapasztalt kimutathatósági aránytól (87%, 21/24, $P > 0,7$). Ugyanakkor a kezelt csoportot kb. 30 perccel később újra megvizsgálva azt tapasztaltuk, hogy csak a petesejtek 25%-ában (5/20) mutatható ki az osztódási orsó. Tapasztalataink szerint a petesejtek morfológiai tulajdonságain alapuló bírálati rendszert kiegészítve az osztódási orsó állapotvizsgálatával, nagyobb biztonsággal válogathatjuk ki a legjobb minőségű petesejteket, amelyeknek nagyobb esélyük van a termékenyülésre, és a továbbfejlődésre. Ezen túlmenően a „spindle view” technikával meghatározhatjuk az orsó helyét is a sejten belül, így elkerülhetjük, hogy a spermiuminjektáláskor megsértsük az orsót és a rajta lévő kromoszóma állományt, ami szintén a termékenyülési eredmények javítását szolgálhatja a jövőben.

A főemlősök szaporodásbiológiája nagyon hasonlít az emberéhez. A főemlősökön végzett asszisztált reprodukciós kutatás nagyon sok olyan információval szolgál, amelyeket az ember hasonló jellegű beavatkozásainál lehet hasznosítani. Különösen nagy jelentőséggel bírnak az olyan jellegű kísérletek, amelyek etikai okok miatt nem végezhetők el az emberen (pl. embriológiai jellegű kísérletek, stb.). A páviánokkal folytatott ART kísérletek céljai voltak: 1. hatékony szuperovulációs protokoll kialakítása; 2. ultrahangos petesejt kinyerési módszer kifejlesztése, valamint 3. a gyűjtött pávián petesejtek IVF-ja.

Az általunk kialakított hormon stimulációs eljárás lényege, hogy GnRH agonistával a hipofízis működését tartósan felfüggesztettük. A hipofízis működés blokkolásának ideje alatt, gonadotrop hormonnal (nagy tisztaságú vizeletből nyert humán FSH-val, illetve rekombináns technológiával előállított humán FSH-val) végzett sorozatkezeléssel, a petefészket többszörös follikulum fejlődésre, illetve petesejt termelésre készítettük. Amikor a follikulumok már megfelelő nagyságúra fejlődtek és az ösztrogén hormontermelésük is kielégítő szintet ért el (amit a szérumban E2 tartalom alátámasztott) hCG-vel indukáltuk a follikulumok és az azokban elhelyezkedő petesejtek végső érését, valamint a follikulumok ovulációját. A hCG befecskendezését követő 30–34. óra között, ultrahangos ellenőrzés mellett, végeztük a follikulum punkciót. A hormonstimuláció ideje alatt folyamatosan (kezdetben másnaponként, majd naponta) ellenőriztük a follikulumok fejlődését egyrészt hormon vizsgálatokkal (szérumban E2 és FSH tartalom), másrészt ultrahanggal. Vizsgálataink igazolták azon várakozásunkat, hogy a pávián nőtények a hipofízis működésének GnRH agonistával történő blokkolásának/gátlásának ideje alatt is képesek ösztrogén termeléssel és petesejtéréssel társult tüszőfejlődéssel válaszolni a humán gonadotrop hormonnal végzett szuperovulációs kezelésre. A hipofízis-működés blokkolásának — főemlősben elsőként általunk — alkalmazott módja gyakorlatiasabb megoldásnak bizonyult az eddigi kezeléseknél, amikor több héten keresztül naponta kell tablettá formájában *per os* vagy injekciós készítményben parenterálisan adni a gyógyszert az állatnak. Tudomásunk szerint, munkacsoportunk közölt elsőként adatokat ultrahangos ellenőrzés mellett végezhető petesejtgyűjtési eljárás sikeres alkalmazásáról páviánban. A gyűjtött petesejtek nagy száma és minősége, valamint a magas kinyerési arány, jól jelzi a módszer hatékonyságát. A biztonságát, pedig az mutatja, hogy kísérleti programjainkban több olyan állat

is részt vett, amelyiket többször szuperovuláltattunk (4 alkalom) és mégsem tapasztaltuk semmi jelét annak, hogy a beavatkozásoknak bármilyen negatív hatása lett volna. A technika biztonságos, nem veszélyezteti sem az állat életét, sem későbbi szaporodását és ezért az eljárás többször megismételhető.

Szerzők címe: Cseh, S.: SZIE Állatorvos-tudományi Kar,
Authors' address: Szülészeti és Szaporodásbiológiai Tanszék és Klinika
Faculty of Veterinary Science, Dept. and Clinic of Obstetrics and Reproduction
H-1400 Budapest, Pf. 2.
Konc, J. – Kanyó, K.: Szent János Kórház, Budai Meddőségi Centrum
Szent János Hospital, Infertility Clinic
H-1125 Budapest, Diósárok u. 1.

MESTERSÉGES TERMÉKENYÍTÉS A KRAJNAI MÉH (*APIS MELLIFERA CARNICA*) TENYÉSZTÉSI PROGRAMJÁBAN*

SZALAINÉ MÁTRAY ENIKŐ — SZALAI TAMÁS — HARKA LÍVIA

SUMMARY: ARTIFICIAL INSEMINATION IN CARNIOLAN BEE (*APIS MELLIFERA CARNICA*) BREEDING PROGRAM

In Hungary, due to geographical and settlement conditions, qualified rearing of queens and drones and controlled breeding can only be done at mating stations or through instrumental insemination. The conditions for establishing a mating station are a 10 km isolation distance and a valley with natural borders which are suitable for the drone congregation area and queen-drone mating place. Experiments and practice, locally and abroad, have provided the background for the effective instrumental insemination practiced today. For successful insemination, we should first be familiar with the anatomy and physiology of the queen and drone, with the management of colonies, the instrumental technology, and sterilization. The basis for selection is the uniform, yearly evaluation of top performance from the 200 main stocks of 5,000 colonies. Breeding stock of 10 drone colonies has been selected (based on honey yield and race morphological characteristics) from the gene pool of the 40 state certified breeders' queen rearing apiaries. The offspring of 30 certified queens ensured the population of the 10 drone breeder colonies. 180 queens in their home apiaries were put into different mating nuclei and transported to the mating station. 75% of the 180 queens came from 12 breeding sites. The success rate of the natural mating was 54%, and the result of instrumental insemination of the remaining 25% was 58%. The size of the mating nuclei can significantly influence the success of mating and the viability of the mated queen as well. In 30% of the forty registered breeding stations in 2003, 100 registered queens are available for producers in 2004.

BEVEZETÉS ÉS CÉLKITŰZÉS

A hazai földrajzi adottságokat tekintve, a méhanya és az általa létrehozott utódok minőségi szaporítása csak ellenőrizhető, ún. pároztatótelepen, természetes párzással, vagy mesterséges termékenyítéssel valósítható meg.

A pároztatótelep feltételei 10 km-es védőkörzet és természetes határral övezett völgy, ami megfelel az anyák és a herék párzási találkozásának, here gyülekezőhelynek.

A mai hazai eredményes (műszeres és mikroszkópos) termékenyítést számos külföldi és hazai kísérlet előzte meg. A sikeres termékenyítés jól megvalósítható, ismerve a méhanya és a hereméh anatómiáját, fiziológiáját, a tartási körülményeket, a termékenyítőkészüléket, az alkalmazott kiegészítő oldat és az optimális életműködés biztosítása érdekében, a fertőtlenítés szerepét (*Ruttner*, 1976; *Vesely*, 1990).

A mesterséges termékenyítés egyik hazai eredménye az ismert származású, ivarérett here nevelése, előkészítése és tartása az inszeminációhoz. Irányított pároztatás esetén a helyi viszonyokat kell figyelembe venni (*Szalainé*, 1995). Többéves előkészület után (*Page és Laidlaw*, 1982) és egy sikeres pályázat segítségével, nagy populáció állt rendelkezésre, amelynek eredménye a tenyésztés progresszív javulása és a beltenyésztés kiküszöbölése.

* A Méhészeti Tenyésztési Program (Magyarországon=TPM) támogatója, a tenyésztés szervezési pályázat keretében, a Földművelésügyi és Vidékfejlesztési Minisztérium

A szelekció alapja a csúcsteljesítmény egységes, évenkénti értékelése (5000 méhcsalád) 200 törzsállományából. Szelekciós cél a genetikai hatások variabilitása, a környezeti hatások és a laborigényes munka minimalizálása. Szelekciót befolyásoló tényezők a család genetikai felépítése, a környezeti és a méhészeti módszerek. A program célja, a tenyésztő méhész számára pároztatótelep működtetése és egy tenyésztési eljárás alkalmazása, egy homogén állomány létrehozásával a méhpopulációban, a kívánatos vonások géngyakoriságának és állandóságának növelése. Jelentősége, hogy a módszer nem függ néhány tenyésztett anyától és a szelekció folyamatos.

ANYAG ÉS MÓDSZER

Kiinduló állomány a krajnai tenyészanyag, amelyben a fajtajelleg meghatározása folyamatos. Mesterséges termékenyítéskor a kevert sperma genetikailag egyenlően reprezentálja a szelektált populációt. Egy méhcsalád sok alcsaládjának széles körű tulajdonság kombinációja felelős a nagy termelésért.

Az államilag elismert tenyésztői populációból, 40, elismert méhanyanevelő-telep génkészlete alapján (adott hordási teljesítmények és jellegzetes fajtabélyegek szerint) kiválasztott, 10 apai tenyészcsaláddal dolgoztunk. A kialakításra került 10 heredajka család, 30, elismert méhanya utódja volt. A 7 telephelyről kikerült 1-1 leánytestvér csoport alkotta a törzsállományt.

A kísérlet ideje hat hétig tartott, az elő- és utómunkálatok további hat hetet vettek igénybe. A beérkezett heredajkák, egy erre a célra kialakított mobil méhes kocsiba kerültek betelepítésre. A heréket, rakodó rendszerű kaptárban, anyarácscsal ellátott fiók akadályozta a kirepülésben. A mesterséges termékenyítéshez a herék nem kerülhetnek ki a zárt térből, ahol külön speciális kezelésben részesülnek. A természetes párzáshoz, adott időpontban, adott apacsaládok álltak rendelkezésre. A folyamatos és irányított párzást, a lépcsőzetesen előkészített tenyészanyag biztosítja.

Az anya- és herenevelés szinkronizálásához az időpontok meghatározása az első feladat. Hereneveléskor viaszcsíkos és herés lép beadásával, majd a méhanya petéztetésével indult a munkafolyamat. A herét biztosító méhcsalád anyja bő élelemforrással, hőkezeléssel ill. CO₂-kezeléssel készíthető herepetezésre. A herék az ivarérésig, 2–3 naponta, a hereröptető fiókban elégtették ki természetes kirepülési igényüket. A here gyűjtését is az egyik oldalán anyarácscsal borított, speciálisan kialakított, hereröptető fiók biztosította. Az ivarérett herét hazai keretméretre kialakított zárkában (30 db/zárka) lehet 2–3 napig károsodás nélkül tartani. A 180 méhanya a saját telepen került különböző típusú pároztatóba és szállítás után a pároztatótelepre. A termékenyítést megelőzően is számos megfigyelésre, ellenőrzésre és az anya zárkázására került a sor. A spermasejtek kisegítő oldatául a bi-desztvizes módszert (*Schafferhans*, 1989) alkalmaztuk. A készülék, a bevált gömbcsuklós szerkezet, a befecskendezésre 50 µl-es üvegkapilláris, a manipulációra 10, ill. 20-szoros nagyítású mikroszkóp szolgált. A méhanyát, az adott évre jellemző, piros számozott fémlappal jelöltük. A sterilizálás alkalmanként hőlégmentizálással ill. a rendszeres fertőtlenítés, 96%-os alkohollal és borszeszégővel történt.

AZ EREDMÉNYEK ÉRTÉKELÉSE

Mobil méhes adott helyet a heredajkáknak és mellette működött a speciálisan kialakított mesterséges termékenyítési laboratórium. 40 ezer here folyamatos fenntartása technikailag biztosított volt. A min. 12. napos herék életképessége, a zárt körülmények között, 20–25. napos korig volt fenntartható károsodás nélkül. A dajkákhöz behelyezett zárkázott herék 3 napig nem károsodtak. A felhasználás során azonban, a herék (kísérő méhek nélkül), legfeljebb egy órát bírtak ki zárkázva.

A 12 tenyésztelepről származó, 180 kihelyezett méhanya 75%-ánál a természetes párzás eredménye 54%-os, a 25%-ánál, a mesterséges termékenyítés eredménye pedig 58%-os volt. A tenyésztelepekre, további vizsgálat céljára, a beküldött méhanyák átlagosan 55%-a, törzskönyvvel ellátva került vissza (1. táblázat).

Mint ahogy azt a táblázat is mutatja, a pároztatók mérete és a pároztatás sikere között összefüggés tapasztalható, ill. jelentősen meghatározhatja a párzás sikerét, ill. a párzott anya életképességét. A párzást megelőző időszakban, különösen első betelepítéskor, és a kicsi pároztató típusok esetében, már az anya kirepülése előtt 30–40%-os volt a veszteség. A méhanyák termékenyítésre történő felhasználásakor, a kísérleti pároztatók egy része elnéptelenedett, a legtöbb esetben a méhanya is elpusztult. A pároztatók kis mérete esetében azok kezelése és a már bepározott anyák védelme sok odafigyelést igényel (több idő, több munka, több költség).

A méhek viselkedése is meghatározó lehet. A lépről lefutó, gyorsabb temperamentumú méh magán viselte a külső (sárga) fajtabélyeget is, és a pároztatóban, az ideges viselkedéssel, nem mutatta az egységes kis család tulajdonságait. Néhány nap alatt többszöri etetést igényelt és az eredmény nem érte el az átlagot.

1. táblázat

A pároztatás eredményessége természetes párzás ill. mesterséges termékenyítés esetén különböző pároztató típusokat figyelembe véve

Tenyésztelő azonosítója	Pároztató száma	Pároztatás sikere, %			Pároztató mérete		
		természetes	mesterséges	átlagos	kicsi	közepes	nagy
045	10	28	66	40			X
021	12	42	0	42		X*	
036	20	81	75	80			X
066	20	14	67	30	X		
055	10	13	60	25		X	
014	20	93	80	90			X
034	15	30	60	40	X		
009	10x	100	66	90		X*	
005	10	43	33	40	X		
042	21	56	40	52	X		
050	20	88	67	85			X
052	12	57	20	42	X		
12 telep	180	53%	58%	55%	5	3	4

X* = azonos a pároztató és a népesség, de különböző időpontban

A zárkában érkeztetett anyák esetében, az első negatív tapasztalatok után kiváló lett az anyásítás, párzás, ill. mesterséges termékenyítés eredménye. Míg első esetben a zárkázott méhanyák 3 nap elteltével elpusztultak az anyátlan dajkában a bádogtető szigetelésének hiánya miatt, addig a második esetben 100-, ill. 66%-os volt a párzási eredmény.

A 2003-ban elismert 40 tenyésztelő 30%-ában, 2004-ben, 100 törzskönyvezett méhanya áll a termelők rendelkezésére.

Az adatok regisztrálásával és a feladatok munkautasításos ütemezésével, egy pároztató-telepi és egy mesterséges termékenyítési módszertan áll a Tenyésztő Szervezet rendelkezésére.

IRODALOM

- Page, R.E. – Laidlaw, H.H.*(1982): Closed population honeybee breeding. Comparative methods of stock maintenance and selective breeding. J. Apicultural Res., 21. 38–44.
- Ruttner, F.*(1976): The instrumental insemination of the queen bee. Bucarest, APIMONDIA Publishing House
- Schafferhans, F.*(1987): Instrumentelle Besamung der Königin – Ein Beitrag zur Verbesserung der Technik. Imkerfreund, 42. 12. 508.
- Szalai Mátay, E.*(1995): Einige Ergebnisse mit künstlicher Besamung von Bienenköniginnen in Ungarn. Pszczelnicze Zeszyty Naukowe, Pulawy XXXIX. 1. 61–69.
- Veszely, V.*(1990): Haltung und Pflege der Jungköniginnen bei natürlicher Paarung und instrumenteller Besamung. Mitteilungen über Bienenbesamung, 2. 2. 8–9.

Szerzők címe: Szalai Mátay, E. – Harka, L.: Kisállattenyésztési Kutató Intézet,
Authors' address: Institute for Small Animal Research, Dept. of Bee Breeding and Bee Biology
H-2100 Gödöllő, Méhészet; e-mail: matray@katki.hu
Szalai, T.: Szent István Egyetem,
Szent István University Inst. of Environmental Management
H-2103 Gödöllő, Páter K. út 1.; e-mail: tszalai@nt.ktg.gau.hu

A GENETIKAI DIVERZITÁS MEGŐRZÉSÉNEK LEHETŐSÉGEI GÍMSZARVASBAN*

ZOMBORSZKY ZOLTÁN

SUMMARY: PRESERVATION OF GENE DIVERSITY IN RED DEER

The excellent genetic potential of the red deer population in Hungary is well known. One of the preservation methods of biodiversity can be the post mortem collected and conserved sperma and oocytes from bagged feral red deer.

BEVEZETÉS

A ma ismert koronás agancsú gímszarvas rasszkör, a holocén korszakban, kb. 20 ezer éve terjedt el a Földön. A 68 kromoszóma számú gímszarvason belül, az alfajok, a regionális változatok, az agancs alakja, tömege és testsúly tekintetében nagy fokú eltéréseket mutatnak. A Kárpát-medencében honos gímszarvas (*Cervus elaphus hippelaphus*) trófea érték mérő tulajdonságai kedvezőbbek, mint a többi alfajé. A hazánkban előforduló gímszarvas-populáció trófea alakja és minősége nem egységes. Az életteri változatok alapján, az ország hat, ún. szarvastájra osztható (Páll, 1985).

Trófeás vadállományaink genetikai anyagának megővését, a genetikai diverzitás megőrzését szorgalmazza, többek között, az urbanizációs infrastruktúra rohamos fejlődése, ami óhatatlanul csökkenti a vadon élő állatok életterét, az új úthálózatok hozzájárulhatnak egyes populációk egymástól való végleges elszigetelődéséhez. A vadkárrok enyhítését célzó erdő- és mezőgazdasági programok (pl. kerítés rendszerek kiépítése) szintén szűkítik az életteret, és egyre inkább megkövetelik nagy vadjaink tudatos létszám apasztását. A parazitás (pl. amerikai nagy májmétely) és egyéb ragályos betegségek behurcolása is folyamatos veszélyforrást jelent erre az állatfajra.

A változékonyság megőrzése mellett, a zárttéri szarvastenyésztési programokban, egy másik tenyésztői cél a homozigóciára való törekvés. A megfelelő genetikai képességű, egyöntetű állat-állományok kialakítása egyik biztosítéka a garantált minőségű szarvashúsnak, ami a korszerű és egészséges táplálkozás egyik kulcseleme lehet, mivel a gímszarvashús zsírban szegény, magas fehérje- és ásványianyag-tartalmú, és a koleszterin-frakciók aránya is kedvező. A rőghöz alkalmazkodott gímszarvast jó alkalmazkodóképessége, hosszú hasznos élettartama, sokoldalú hasznosíthatósága, kedvező zootechnikai tulajdonságai és a gazdálkodási tapasztalatok tehetik versenyképessé a hagyományos állattenyésztési ágazatokkal (Horn és mtsai, 2001).

A vadgazdálkodás, a területfejlesztés és a környezetvédelem számára új, ma még nem igazán kiaknázott lehetőség hazai nagyvadjaink zárttéri tenyésztése. A módszer tudatos szelekciós munkát tesz lehetővé, így a homozigóciára

* A vizsgálatokat az FVM 67.868/2003 pályázat támogatta

való törekvés mellett, a kontrollált feltételek, a faj biodiverzitását is biztosíthatják, génrezervátumok létesítésével.

Korábbi vizsgálataink szerint, a vadásztatás során kilőtt kapitális bikák genetikai anyaga megőrizhető a mellékheréből *post mortem* kinyert, túlélő ondósejtek mélyhűtve tárolásával (Zomborszky és mtsai, 1994, 1996, 1999). Így lehetőség van a jövő számára, a mai genetikai állomány hosszú távú, biztonságos megőrzésére, egy hazai szarvas-spermabank létrehozásával. Az optimális tárolás feltételeinek kidolgozása érdekében, elejtett bikák mellékheréből, *post mortem* kinyert termékenyítő anyagot, különböző spermahígítási, és mélyhűtési módszerekkel vizsgáltuk, a szarvas fajokra korábban sikerrel adaptált, fénymikroszkópos spermafestési eljárással (Nagy és mtsai, 2001). Eredményeink szerint mind a kétfázisú Tris-tojássárgája, mind az egyfázisú Triladyl hígító alkalmas a szarvasbikák spermájának hígítására. Az automata készülékkel végzett, programozott fagyasztás mellett, a házilagos kivitelezésű hungarocell-dobozban folyékony nitrogéngőzben végzett mélyhűtés is alkalmas a genetikai anyag tartósításához (Zomborszky és mtsai, 2003).

ANYAG ÉS MÓDSZER

Jelen munkákban, a *post mortem* kinyert spermiumok tárolhatóságát, „üzemi”, vadászati körülmények között vizsgáltuk. A kutatási feladatnak megfelelően, kérdésfeltevésünk az volt, hogy milyen logisztikai lépések szükségesek ahhoz, hogy a vadonban elejtett csúcs genetikájú, kapitális gímszarvas bikák termékenyítő anyagát hatékonyan, hitelesen és a hatályos jogszabályoknak megfelelően megőrizzük.

A kutatási munka első fázisában, erdészeti és vadászati cégekkel együttműködve, a mintavétel lehetőségét vizsgáltuk.

Gímszarvas bikákból mintavételre a bögési időszakban, vadászterületen, 2003. szeptember 14. és 20. között volt lehetőség. Az elejtést követő 1,5–15 órával, nyolc bika mellékheréjének steril feltárása után nyert spermatömeget, tojássárgájával kezelt Triladyl-lal hígítottuk. A hígított spermamintákat 40 °C-on tárolva, a kiegyenlítőidőt követően, automata spermafelszívó segítségével, jelölt, 0,25 ml-es műszalmába szívtuk. A műszalmázott termékenyítő anyagot, házilagos készítésű hungarocell-dobozban, folyékony nitrogéngőzben fagyasztottuk.

A visszaolvasztott spermamintákat, az Országos Mezőgazdasági Minősítő Intézetben, a többször módosított 39/1994. (VI.28.) sz. FM rendelet alapján minősítettük, továbbá az élő, ép akroszómájú ondósejtek felolvasztás utáni arányát, mintánként két-két kenetben 200 sejtet számolva, Kovács és Foote (1992) festési módszerével értékeltük Nagy és mtsai (2001) eljárása alapján. Az előbbi eljárás vizsgálta a minták higiénia állapotát, valamint szubjektív módszerrel, az élő sejtek motilitását (1. táblázat). Az utóbbi festési technika pedig, a sejtek membrán épségét értékelte (1. ábra).

1. táblázat:

Adatok a lőtt gímszarvas bikák ondósejtjeinek mélyhűtve tárolásáról

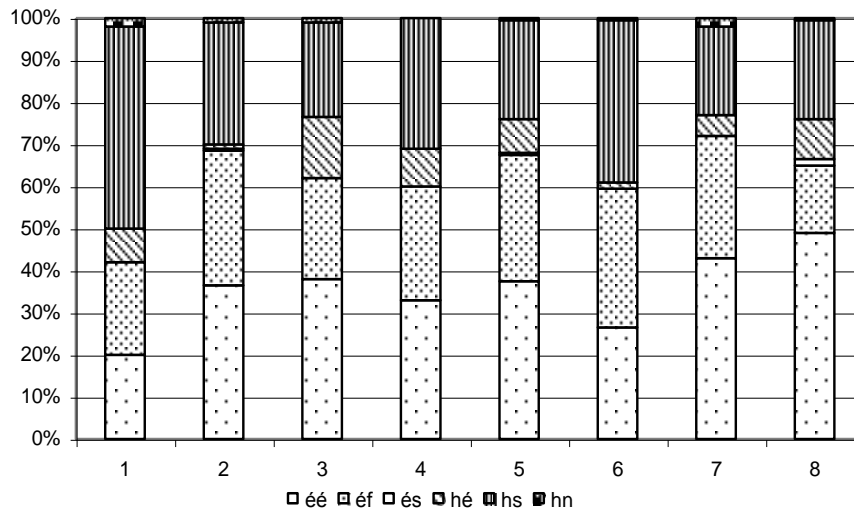
Gímszarvas (1)	Mintavétel ideje*, óra (2)	Mélyhűtés ideje*, óra(3)	Műszalma, db(4)	Koncentráció (10 ⁶ /0,25 műszalma)(5)	Motilitás, % (6)
1	15	19	16	102	45
2	14	18	35	158	45
3	11	15	45	96	20
4	5	9	38	45	45
5	3	13	68	56	45
6	3	6	32	89	36
7	1,5	4	42	146	45
8	1,5	4	29	101	45

Megj.: a spermaminták, a 39/1994 FM rendeletben foglalt higiéniai előírásoknak megfeleltek(7)

* a lelövés után

Table 1: Data of the hunting stags's cryopreserved spermatozoa red deer(1), sampling after hunting, hours(2), cryopreservation after hunting, hours (3), straw, n(4), concentration (10⁶/0,25 straw) (5), motility, %(6), Note: sperm samples are suitable of hygiene perceptions(7)

1. ábra: A visszaolvasztott gímszarvas spermiumok membrán integritásának vizsgálata



Megj.: éé=élő fej, ép akroszóma, ép farok(1), éf=élő fej, ép akroszóma, festett farok(2), és=élő fej, sérült akroszóma(3), hé=halott fej, ép akroszóma(4), hs=halott fej, sérült akroszóma(5), hn=halott fej, levált akroszóma(6)

Fig. 1: Evaluation of membrane integrity of frozen/thawed red deer spermatozoa

Notes: éé=living cell intact head and tail membrane and acrosome(1), éf=living cell intact head and acrosome, stained tail(2), és=living cell intact head, damaged acrosome(3), hé=dead head with intact acrosome(4), hs=dead head with damaged acrosome(5), hn=dead head, loose acrosome(6)

EREDMÉNYEK, KÖVETKEZTETÉSEK

A visszaolvasztott gímszarvas spermamintákról, a táblázat és a diagram adatai alapján, a következő főbb tendenciák, következtetések vonhatók le.

Az elejtést követő 1,5. és a 15. óra között nyert spermaminták motilitása megfelel a szarvasmarhában előírt kritériumnak.

A minták ugyancsak megfeleltek a már jelzett rendeletben előírt, higiéniai követelményeknek.

A mellékherében lévő sejttömeg egyedi különbségeket mutatott. Ez származhat életkortól, vagy például abból, hogy az elejtés előtt a bika borított-e. Ezért a hígítás mértéke nem szabványosítható és ebből adódik az eltérő hígítási mérték, valamint a tárolt műszalma mennyiség.

A sperma koncentrációra vonatkozó adatok és a membrán integritási százalékok azt mutatják, hogy az általunk kezelt gímszarvas minták a kívántnál sejtűsőbbek. A jövőben, a véghígításokat 20 millió élő sejtire kell laboratóriumi körülmények között beállítani.

A membrán-integritási vizsgálatok szerint az elejtéshez képest korábbi időpontban gyűjtött minták élő sejt aránya magasabb (7. és 8. sorszámú), mint a későbbben nyert mintáké.

A genetikai sokszínűség megőrzésének egy másik, kézenfekvő, még nem kutatott megoldási lehetősége a kilőtt nőivarú állatok genetikai anyagának a megóvása. Sikeres petefészkek-gyűjtési módszer kidolgozása lehetőséget teremthetne egyrészt a petesejtek mélyhűtésére, másrészt azok érlelésére és *in vitro* termékenyítésére. A *post mortem* nyert hímivarsejtekből és petesejtekből előállított IVF embrió, már mindkét ivar genetikai állományának megőrzését lehetővé tenné.

A távlati tervek szerint egy hazai szarvas-génbank alapja lehet a kedvező tulajdonságokat hordozó állatok genetikai markerekkel való szűrése. A későbbiekben megismert nagy hatású gének így célzottan bevonhatók a nemesítésbe. A hazai gímszarvas genetikai adottságainak fejlesztését a vadgazdálkodás mellett, így a tenyésztett, a farmszerű körülmények között tartott állományok is elősegíthetik.

Összefoglalva megállapítható, hogy egy gímszarvas biotechnológiai projekt megvalósítása, a hazai szarvas-állomány genetikai variációjának megőrzését segíti elő. A spermabankra építve pedig, megkezdhetjük egy *in vivo* és *in vitro* embrióbank lehetőségének kidolgozását is. Egyik nemzeti kincsünket óvhatnánk meg ezzel a módszerrel, a kedvezőtlen és nem várt környezeti hatásoktól.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

A kutatási feladat eddigi munkáiban köszönettel tartozom az FVM Vadászati és Halászati Főosztályának és együttműködő partnereinknek. Így a Somogyi Erdészeti és Faipari Rt.-nek, a gímszarvas mintagyűjtés lehetőségének a megteremtésért Barkóczi István vezérigazgató úrnak, Buzgó József és ifj. Jakus László fővadász uraknak. Köszönetemet fejezem ki az OMMI részéről hasznos tanácsaiért Dr. Flink Ferenc és Dr. Péntek István állatorvos uraknak, az OMT Rt megbízott igazgatójának, Zándoki Bélának a projekthez szükséges anyagok és

eszközök beszerzéséhez nyújtott támogatásáért. Köszönet Nagy Szabolcs és Zubor Tibor kollegáimnak, valamint Nánássy László doktorandusznak kutatói együttműködésükért, és nem utolsósorban Horn Péter akadémikus úrnak támogatásáért.

IRODALOM

- 39/1994.(VI. 28.) FM-rendelet. A mesterséges termékenyítésre használt bikákra és kanokra, továbbá azok spermájára vonatkozó előírások.
- Horn, P. – Nagy, J. – Zomborszky, Z.(2001): A gímszarvas-tenyésztés hazai tapasztalatai. A zárttéri vadtartás időszzerű kérdései, távlatai. Szimpózium, Kaposvár, 13–19.
- Kovács, A. – Foote, R.H.(1992): Viability and acrosome staining of bull, boar and rabbit spermatozoa. *Biot. Histic.*, 67. 119–124.
- Páll, E.(1985): A gímszarvas és vadászata. Mezőgazdasági Kiadó, Budapest
- Nagy, Sz. – Kovács, A. – Zubor, T. – Zomborszky, Z. – Tóth, J. – Horn, P.(2001): Evaluation of membrane integrity of frozen/thawed deer spermatozoa. *Acta Vet. Hung.*, 49. 223–227.
- Zomborszky, Z. – Nagy, Sz. – Kovács, A. – Horn, P.(2003): Szarvas-génbank kialakításának lehetőségei. MTA Állatorvos-tudományi Bizottságának beszámolója, Takarmányozástani–Állathigiéniai szekció. Budapest
- Zomborszky, Z. – Zubor, T. – Tóth, J.(1994): Possibilities for improving the genetic potential of red deer by biotechnological methods. 3rd Int. Cong. Biol. Deer, Edinburgh, 60.
- Zomborszky, Z. – Zubor, T. – Tóth, J. – Horn, P.(1996): Biotechnológia a gímszarvas-tenyésztés szolgálatában. XII. Állat-biotechnológiai Kerekasztal Konferencia, Sárvár-Bécs
- Zomborszky, Z. – Zubor, T. – Tóth, J. – Horn, P.(1999): Sperm collection from shot red deer stags (*Cervus elaphus*) and the utilisation of sperm frozen and subsequently thawed. *Acta Vet. Hung.*, 47. 263–270.

Szerző címe: Kaposvári Egyetem Állattudományi Kar
Author's address: University of Kaposvár Faculty of Animal Science
H-7400 Kaposvár, Guba Sándor utca 40.

A VADÁSZGÖRÉNY (*MUSTELA PUTORIUS FURO*) IVARI MŰKÖDÉSÉNEK JELLEMZŐI ÉS BEFOLYÁSOLÁSÁNAK LEHETŐSÉGEI

PROHÁCZIK ANGELLA — KULCSÁR MARGIT — HUSZENICZA GYULA

SUMMARY: ENDOCRINE TREATMENT PROCEDURES USED TO SUPPRESS THE CYCLIC OVARIAN FUNCTION IN DOMESTIC FERRETS (*MUSTELA PUTORIUS FURO*)

The authors summarise their personal experiences with the various methods offered to suppress the ovarian activity of jills, such as administration of hCG, the use of synthetic gestagens and subcutaneous insertion of long acting GnRH implants. In order to monitor their ovarian function, the jills (n=25) involved in this study were sampled for ELISA determination of fecal progesterone metabolites (P₄-met) content.

A menyétfélék (*Mustelidae*) családjába tartozó vadászgörény (*Mustela putorius furo*) egyike az ember által már több száz éve tenyésztett, de ennek ellenére is, a korábbiakban inkább csak félig háziasított emlősfajainknak. A kedvtelésből tartott egyedek száma napjainkban, hazánkban néhány ezerre, az USA-ban, Kanadában és Nyugat-Európa országaiban, összességében, néhány millióra tehető. A nőstények 8–12. hónaposan érik el az ivarérettséget. A görény ivarzási időszaka március közepén kezdődik. A faj egyes szaporodás-élettani jellemzői, a domesztikáció során jelentősen megváltoztak. Jó példája ennek, hogy — szemben vadon élő fajtársaikkal — a háziasított változat esetében ivarzó egyedekkel kb. augusztus végéig, vagy lakásban tartott egyedeknél, az év bármely szakában találkozhatunk.

A hímeiktől izoláltan tartott nőstényekben párzás hiánya miatt — szigorúan reflexovulátor volta miatt — nem alakul ki preovulációs LH csúcs, az érett tüszők elsorvadnak (atresia), majd csakhamar egy újabb tüszőnövekedési hullám veszi kezdetét. A tüszőnövekedés egymást követő hullámokban folyamatosan magas ösztrogén szintet biztosít. Ennek hatására az állat szinte megszakítás nélkül, heteken át ivarzik. Az elhúzódó E2-hatás következményeként — esetenként drasztikus mértékű — szőrhullás, továbbá aplasztikus anémia kialakulását eredményező súlyos csontvelő-károsodás léphet föl, ami akár az állat elhullását is okozhatja.

A folyamat megelőzésére — ha az ivarzó nőstényt nem kívánjuk fedeztetni — indokolt a tüszőrepedés, illetve az ezt követő álvemhességi CL-képződés mesterséges kiváltása. Az ovuláció a preovulációs LH-csúcs hatását imitálni képes hormonkészítmény befecskendezésével (100 NE humán choriogonadotropin, hCG) idézhető elő. A lakásban, társállatként tartott egyedek esetében az ivartalanítás is megoldás jelenthet, bár újabb megfigyelések szerint ez hajlamosít a mellékvese-kéreg bizonyos szteroid hormonok termelésére képes dagantainak kialakulására. Kutyában, macskában, és egyes állatkertben tartott emlősökben, így a görényekben is, a tüszőnövekedés elnyomására különböző, hosszú hatásidejű első (medroxiprogesteron acetát, MAP), ill. második gene-

rációs (proligesztin, PROL) szintetikus gesztagéneket alkalmazhatunk. Ezek azonban egyrészt gyakran pyometrára hajlamosíthatnak, másrészt, pedig kortizol-szerű hatásuk miatti atrogén Chusing-betegséget idézhetnek elő. Jelenleg egy új hormonkészítmény, egy hosszú hatású GnRH analóg használata nyújthat hatásos és biztonságos megoldást az ivarzás megelőzésére, ill. blokkolására, bár a görényen való alkalmazásának nincs elérhető irodalmi háttere.

A fent említett hormonkészítmények hatékonyságának, illetve hatástartamának összehasonlítása céljából, 25 nőstény állatot kezeltünk. Az ivarzási időszak előtt (februárban) az első csoport 15 mg MAP-ot, a második 40 mg PROL-t, a harmadik egy hosszú hatásidejű GnRH analógot (4,7 mg Deslorelin acetát) kapott. A negyedik csoportot 100 NE hCG-vel kezeltük az év első tüzelelésekor, az ötödik csoport volt a kezeletlen kontroll. A petefészek működését, a bélsár gesztagén metabolit tartalmának ELISA meghatározásával, 10 hónapon át monitoroztuk. A bélsár gesztagén metabolit profilt összevetettük a klinikai eredményekkel.

A GnRH implantátum röviddel az applikálás után intenzív ivarzási tüneteket indukált, amely azonban egy héten belül megszűnt és a petefészek-működés minden nőstényben az év végéig blokkolódott. Mind a MAP, mind a PROL, rövidebb-hosszabb időre elnyomta ugyan a petefészek működését, de két esetben, mellékhatásként, progresszív szőrhullást tapasztaltunk és az állatok szinte mindegyike, még a nyár folyamán, ismét ivarzott. A hCG kezelés lerövidítette az ivarzást, a 6 hetes álvemhességi periódus után, az állatok ivarzni kezdtek. Méhgyulladás egy esetben sem tapasztaltunk.

Eredményeink szerint a GnRH analóg hatására jelentős különbség látszik a szintetikus gesztagének és a Deslorelin implantátum hatékonysága között.

Szerzők címe: Szent István Egyetem, Állatorvos Tudományi Kar
Authors' address: Szent István University, Faculty of Veterinary Science
H-1400 Budapest, Pf. 2.

EURÓPAI UNIÓS ELŐÍRÁSOK AZ EMBRIÓ-ÁTÜLTETÉS TERÜLETÉN

(EU REGULATIONS OF THE EMBRYO TRANSFER)

FLINK FERENC

A házi haszonállatok művi szaporítási eljárásainak (mesterséges termékenyítésének, embrió-átültetésének) közösségi szabályozása 10-15 éves múltat tekint vissza.

A művi szaporodási tevékenység regulációja a zootechnikai műveletek szabályozása körébe tartozik és ezzel a közösségi vívmányok, azaz az „acquis communautaire” része. A szabályozás, a haszonállatfajok közül kiemelten kezeli a szarvasmarhát — a Tanács 89/556 EGK irányelve a házi szarvasmarha fajokhoz tartozó háziállatok embrióinak Közösségen belüli kereskedelmét és a harmadik országból történő behozatalát szabályozó állategészségügyi követelményekről szól — de a sertésen kívül, a többi állatfajra nem specifikus. „A Tanács 92/65 EGK irányelve a 90/425/EGK irányelv A/1 mellékletében említett, meghatározott Közösségi előírásokban megállapított állategészségügyi követelmények hatálya alá nem tartozó állatok spermájának, petesejtjeinek, embrióinak a Közösségen belüli kereskedelmét és a Közösségbe való behozatalát szabályozó állategészségügyi követelményekről” c. joganyag vonatkozik rájuk.

Az uniós szabályozás kiterjed mind az állattenyésztési feltételrendszerre, mind az állategészségügyi követelményekre. Alapelv, hogy embriót előállítani, forgalmazni, felkínálni, értékesíteni, csak embrió átültető állomásról szabad. Külön fontosságot kap a dokumentáció és a certifikációs követelmények teljesítése, az embriók úti okmányainak egységesítése, ami a biotechnikai termék piacra jutásának adminisztratív feltételét képezi. A szabályozás részletesen kitér az embrió átültető állomások létesítésének és működtetésének személyi, tárgyi, technológiai és épületgépészeti követelményeire. Az embrió átültető állomások fertőzésvédelmét járványügyi létesítményekkel és intézkedésekkel kell biztosítani. Az állategészségügyi kontroll az állami hatósági felügyeleten és az embrió átültető team felelős állatorvosán keresztül érvényesül. A szabályozás állatfajonként tartalmazza az embrió előállításra használt donor egyedek állategészségügyi feltételrendszerét, a kimosások, laboratóriumi manipulációk higiénikus technológiáját. Nagy súlyt helyez az embriók mindenkori azonosíthatóságára az előállítás, a tárolás, a felhasználás során.

Hazánk Közösségi integrációja kapcsán megalkotott 61/2002 (VIII.1.) FVM számú miniszteri rendelet, szövegében szinte teljesen ekvivalens a hatályos EU joganyag előírásaival.

Szerző címe: Országos Mezőgazdasági Minősítő Intézet
Author's address: Institute of Agricultural Quality Control
H-1024 Budapest, Keleti K. u. 24.

