

Szent István Egyetem

**HÍMIVARSEJTEK ÉS KORAI IVARSZERV-SZÖVETEK
MÉLYHŰTÉSES TARTÓSÍTÁSÁNAK FEJLESZTÉSE
BAROMFIFAJOKBAN GÉNMEGŐRZÉSI CÉLOKBÓL**

VÁRADI ÉVA

Gödöllő

2016

A doktori iskola

megnevezése: Állattenyésztés-tudományi Doktori Iskola

tudományága: Állattenyésztés-tudomány

vezetője: Dr. Mézes Miklós
egyetemi tanár, az MTA doktora
SZIE, Mezőgazdasági- és Környezettudományi Kar
Állattudományi Alapok Intézet
Takarmányozástani Tanszék

Témavezető: Dr. Barna Judit
tudományos főmunkatárs, címzetes egyetemi tanár
Haszonállat-génmegőrzési Központ
Genetikai és Szaporodásbiológiai Kutatócsoport

.....
Az iskolavezető jóváhagyása

.....
A témavezető jóváhagyása

TARTALOMJEGYZÉK

| | |
|---|----|
| TARTALOMJEGYZÉK | 2 |
| RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE | 5 |
| 1. BEVEZETÉS | 6 |
| 1.1. Célkitűzések | 8 |
| 2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS | 10 |
| 2.1. A madarak szaporodásbiológiai sajátosságai | 10 |
| 2.1.1. A nőivarú madarak szaporodásbiológiai sajátosságai | 10 |
| 2.1.2. A hímivarú madarak szaporodásbiológiai sajátosságai | 11 |
| 2.1.3. Megtermékenyülés és embrióelhalások | 11 |
| 2.2. Az ondómélyhűtés folyamata és a mélyhűtési eljárások | 13 |
| 2.2.1. A mélyhűtés folyamata | 13 |
| 2.2.2. Krioprotektív anyagok | 15 |
| 2.2.3. Ondómélyhűtési eljárások technikái | 16 |
| 2.3. A madár hímivarsejtek mélyhűtéses tartósítása | 17 |
| 2.3.1. A házi tyúk spermiumainak mélyhűtéses tartósítása | 18 |
| 2.3.2. A gyöngytyúk-spermiumok mélyhűtéses tartósítása | 21 |
| 2.3.3. A pulykaspermiumok mélyhűtéses tartósítása | 21 |
| 2.3.4. A víziszárnyas-fajok spermiumainak mélyhűtéses tartósítása | 22 |
| 2.3.5. Nem domesztikált madárfajok spermiumainak mélyhűtéses tartósítása | 24 |
| 2.4. Korai ivarszerv-szövetek mélyhűtéses tartósítása | 26 |
| 3. ANYAG ÉS MÓDSZER | 30 |
| 3.1. Ondómélyhűtési kísérletek házityúk-fajban (<i>Gallus domesticus</i>) | 30 |
| 3.1.1. Kísérleti állatok és ondóvétel | 30 |
| 3.1.2. Ondóminősítés | 30 |
| 3.1.3. Ondómélyhűtési protokollok | 32 |
| 3.1.4. Mesterséges termékenyítés | 34 |

| | |
|---|----|
| 3.2. Ondómélyhűtési kísérletek gyöngytyúk-fajban (<i>Numida meleagris</i>)..... | 36 |
| 3.2.1. Kísérleti állatok és ondóvétel | 36 |
| 3.2.2. Ondóminősítés..... | 36 |
| 3.2.3. Ondómélyhűtési protokollok..... | 37 |
| 3.2.4. Mesterséges termékenyítés..... | 38 |
| 3.3. Ondómélyhűtési kísérletek házilúd-fajban (<i>Anser anser</i>)..... | 39 |
| 3.3.1. Kísérleti állatok és ondóvétel | 39 |
| 3.3.3. Ondómélyhűtési protokollok..... | 40 |
| 3.3.4. Mesterséges termékenyítés..... | 41 |
| 3.4. A korai ivarszerv-szövetek mélyhűtési kísérletei..... | 42 |
| 3.4.1. Kísérleti állatok, donor ivarszervek eltávolítása | 42 |
| 3.4.2. Korai ivarszervek mélyhűtése | 43 |
| 3.4.3. Szövettani vizsgálatok..... | 45 |
| 3.4.4. Szövettenyésztési vizsgálatok | 45 |
| 3.5. Statisztikai analízis..... | 46 |
| 4. EREDMÉNYEK | 48 |
| 4.1. Ondómélyhűtési kísérletek házityúk-fajban..... | 48 |
| 4.1.1. <i>In vitro</i> vizsgálatok..... | 48 |
| 4.1.2. <i>In vivo</i> vizsgálatok / Mesterséges termékenyítés | 49 |
| 4.2. Ondómélyhűtési kísérletek gyöngytyúk-fajban..... | 50 |
| 4.2.1. <i>In vitro</i> vizsgálatok..... | 50 |
| 4.2.2. <i>In vivo</i> vizsgálatok / Mesterséges termékenyítés | 53 |
| 4.3. Ondómélyhűtési kísérletek házilúd-fajban..... | 54 |
| 4.3.1. <i>In vitro</i> vizsgálatok..... | 54 |
| 4.3.2. <i>In vivo</i> vizsgálatok / Mesterséges termékenyítés | 55 |
| 4.4. A korai ivarszerv-szövetek mélyhűtési kísérletei..... | 56 |
| 4.4.1. Szövettani vizsgálatok..... | 57 |
| 4.4.2. Szövettenyésztési vizsgálatok | 64 |

| | |
|---|-----|
| 5. KÖVETKEZTETÉSEK ÉS JAVASLATOK..... | 66 |
| 5.1. Ondómélyhűtési kísérletek..... | 66 |
| 5.2. Korai ivarszerv-szövetek mélyhűtési kísérletei..... | 70 |
| 5.3. Új tudományos eredmények..... | 72 |
| 6. ÖSSZEFOGLALÁS..... | 74 |
| 7. SUMMARY..... | 78 |
| 8. MELLÉKLETEK..... | 82 |
| M1. Irodalomjegyzék..... | 82 |
| M2/a. Spermium-koncentrációs görbék - fogolyszínű magyar kakasok..... | 100 |
| M2/b. Spermium-koncentrációs görbék - magyar parlagi gyöngytyúk kakasok..... | 101 |
| M3. Az ondómélyhűtési eljárásokban alkalmazott ondóhígítók összetétele..... | 102 |
| M4. <i>In vitro</i> vizsgálatok adatai - házityúk-faj..... | 103 |
| M5/a. <i>In vitro</i> vizsgálatok adatai (ondóminősítés) - gyöngytyúkfaj..... | 104 |
| M5/b. <i>In vitro</i> vizsgálatok adatai (rendellenességek vizsgálata) - gyöngytyúkfaj..... | 105 |
| M6. <i>In vitro</i> vizsgálatok adatai - házilúd-faj..... | 106 |
| 9. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS..... | 107 |

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

CASA: Computer Assisted Sperm Analyzer

DAD-IS: Domestic Animal Diversity Information System

DAP 213: 2M dimetil-szulfoxid, 1M acetamid, 3M propilén-glikol

DMA: dimetil-acetamid

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle's Medium

DMF: dimetil-formamid

DMSO: dimetil-szulfoxid

DPBS: Dulbecco's Phosphate Buffered Saline

EG: etilén-glikol

FAO: Food and Agriculture Organization of the United Nations

FBS: Fetal Bovine Serum

MA: metil-acetamid

MF: metil-formamid

1. BEVEZETÉS

Földünk globális problémái közül a biodiverzitás megőrzése kiemelt fontosságú, azonban a gazdasági haszonállataink genetikai sokszínűségének megőrzését a folyamatosan jelen lévő élelmiszerhiány nehezíti. Baromfi esetében a túlnépesedésből adódó élelmiszerhiány és az ezzel párhuzamosan növekvő húsfogyasztás az intenzív baromfifajok térhódítását eredményezte. A minél nagyobb húskihozatalt célzó keresztezési programok nem vették figyelembe a génmegőrzési szempontokat, ezért a génállomány eróziójához vezettek (*Bessei, 1989*). Mivel a környezeti kondíciók egyöntetűvé válása miatt kevesebb fajtára volt szükség, az állatállományok genetikai diverzitása csökkent (*Tisdell, 2003*). Ezen belül - sajnálatos módon - háttérbe szorultak az őshonos baromfifajok is, melyek genetikai erőforrása adná a genetikai fejlődés és változatosság bázisát, amely lehetővé tenné a helyi környezethez alkalmazkodó fajták létrehozását. Napjainkra az ismert 9672 madárfajból 503 faj a „veszélyeztetett” vagy „kritikusan veszélyeztetett” kategóriába sorolható (*Blanco et al., 2009*). Házi madarak vonatkozásában a Domestic Animal Diversity Information System-ben (DAD-IS) regisztrált baromfifajták több mint 50%-a veszélyeztetett kategóriába tartozik (*Hoffmann, 2005*). Hazánkban az őshonos és védett magyar baromfifajták génmegőrzési programjai és a tenyésztőszervezeti munka a Magyar Kisállattenyésztők Génmegőrző Egyesületének (MGE) keretei között valósul meg (*Szalay, 2004*).

A génmegőrzés és a biodiverzitás fontosságának előtérbe kerülése genom- és adatbankok létrehozását és fejlődését vonta maga után (*Boa-Amponsem et al., 2004*). A világ számos részén működő génbankoknak három fajtáját különböztetjük meg. Az *in situ* génbankokban (1) az őshonos fajtákat eredeti tartózkodási helyükön kisebb-nagyobb állományokban tartják fent és tenyésztik, míg az *ex situ in vivo* génbankokban (2) erre a célra kialakított farmokon, távolabb az ősi tartózkodási helytől, nukleusz populációkban őrzik az állatokat. Nyilvánvaló, hogy ezek az állományok számos veszélynek vannak kitéve (fertőző betegségek, természeti katasztrófák, ragadozók pusztítása). Következésképpen a genetikai diverzitás biztonságos megőrzését ezek a módszerek önmagukban nem garantálják. Ezért szükséges *ex situ in vitro* génbankok (3) kialakítása is, ahol az ezen állományokból származó ritka, értékes genetikai anyagot hordozó hím- és női ivarsejteket, embriókat, embrionális sejteket, illetve szöveteket, vagy korai ivarszervszöveteket, valamint DNS mintákat mélyhűtött állapotban, hosszútávon őrzik.

Jelenleg a világon csak öt olyan regisztrált nemzeti génbank működik, ahol őshonos baromfifajták genetikai anyagát (is) tárolják. A Francia Nemzeti Génbank mellett Hollandiában, Spanyolországban, Észak-Amerikában és Japánban tárolnak mélyhűtött mintákat (*Blesbois et al., 2007; Woelders et al., 2006; Santiago-Moreno et al., 2011; Blackburn, 2006, Nirasawara et al.,*

1995). Azonban egyre több országban (Ukrajna, Németország, Magyarország) dolgoznak jelenleg is baromfi génbankok kialakításán (*Tereshchenko et al., 1992; Ehling et al., 2012; Barna et al., 2014*). Az *in vitro* génbankok létrejöttével gyorsabban lehet új vonalakat, illetve fajtákat kialakítani, emellett támogatják az *in vivo* génbankokat is azáltal, hogy csökkenthetik a beltenyésztést és a génsodródást a kis populációkban (*Woelders et al., 2006*).

A génmegőrzési szempont mellett számos gyakorlati előnnyel is jár pl. a spermabankok kialakítása: egyszerűbb és olcsóbb a mélyhűtött ondót szállítani, mint a tenyészállatot, nem szükséges az állatszállítással járó stressznek, illetve elhullási veszélynek kitenni az állatokat (*Saint Jalme et al., 2003*), valamint nincs szükség karanténra, akklimatizálódásra, stb. (*Sakhatsky et al., 1995*). Hátránya lehet azonban, hogy az ondómélyhűtés során nemcsak a szaporítóanyagot, hanem egyes baromfibetegségek kórokozóit is konzerválhatjuk. Kutatások bizonyították, hogy a Marek-féle betegség vírusa házi tyúk esetében a mélyhűtött ondómintában kimutatható volt (*Sevoian, 1971*), illetve a mélyhűtött pulykaondóban nem csökkent az életképes *Mycoplasma meleagridis* kórokozó mennyisége a hat hónapos tárolás alatt (*Ferrier et al., 1982*).

Az *in vitro* génmegőrzés legpraktikusabb módja jelenleg - madarak esetében - az ondó mélyhűtéses tartósítása (*Gee, 1995; Reedy et al., 1995*). Mivel madaraknál a nőivar a heterogametikus szex (ZW) a spermiumok mélyhűtésével csak a hím genomot (ZZ) tudjuk megőrizni. Bár hat-nyolc generációs visszakeresztezésekkel majdnem 100 %-ban visszanyerhető az eredeti genotípus (*Blesbois, 2007*), emellett szükséges új, alternatív módszerek kidolgozása a teljes genom fenntartása érdekében. A petesejtek mélyhűtésével megőrizhető lenne a W kromoszóma, azonban a megalecitális tojás biofizikai sajátosságai miatt ez az eljárás madarak esetében nem alkalmazható (*Blesbois és Labbé, 2003; Massip et al., 2004*). A korai embrionális sejtek, úgymint a blasztodermális sejtek, illetve primordiális őscsírasejtek felhasználásával történő kiméra előállítás azonban megoldást jelenthet a teljes genetikai anyag megőrzésére (*Tajima, 2002*). Mivel ezen eljárások hatékonysága egyelőre gyenge és meglehetősen költségesek, így génmegőrzési programokban való alkalmazásuk egyelőre nem elterjedt (*Petitte, 2006*). A nőivar genetikai állományának megőrzésére megoldást jelenthet a naposkori petefészekszövet mélyhűtése, majd az így konzervált ivarszerv recipiens állatokba való beültetése (*Song és Silversides, 2006*). A módszer génmegőrzési programokban való alkalmazásához azonban még várat magára egy hatékony, egyszerűen alkalmazható mélyhűtési és transzplantációs eljárás kidolgozása. Ezek a vizsgálatok több kutató-laboratóriumban folyamatban vannak, többek között intézményünkben is.

A Haszonállat-génmegőrzési Központ (HáGK) a régi magyar baromfifajták génrezerv állományként való fenntartásában a 90-es évek közepétől úttörő tevékenységet végez (*Szalay, 2002*). Az Intézetben évtizedek óta meglévő *ex situ in vivo* génbank mellett a Baromfi

Szaporodásbiológiai Laboratóriumban 2014 óta fejlesztés alatt áll egy *in vitro* génbank is, melyben az őshonos magyar baromfifajták ondómintáinak mélyhütéses betárolása pillanatnyilag is folyik. A kutatócsoportunk által eddig végzett ondómélyhütési vizsgálatok eredményei biztatóak, fontosnak tartjuk az eddig ismert módszerek továbbfejlesztését, kiegészítve az *in vitro* génmegőrzés egyéb alternatíváival (a korai embrionális sejtek, valamint ivarszerv-szövetek mélyhütéses tartósításának kidolgozásával), mely elősegíti a nőivar bevonását a génmegőrzési programokba.

Közel 10 éves tevékenységem az Intézet Szaporodásbiológiai Laboratóriumában elsősorban az egyes baromfifajok ondómélyhütési összehasonlító vizsgálataira irányult, mely területtel hazánkban egyedül itt foglalkozunk. Az utóbbi években emellett aktívan részt veszek az embrionális sejtek mélyhütési munkálataiban, valamint a korai ivarszerv-szövetek mélyhütési eljárásainak kidolgozásában is.

1.1. Célkitűzések

- Kutatásaim célja olyan fajspecifikus ondómélyhütési eljárások kidolgozása, amelyek a gyakorlatban egyszerűbben, kevesebb beruházással, környezetkímélőbb módon, mégis hatékonyan alkalmazhatók. Vizsgálataim célja a *házi tyúk*, *gyöngytyúk*, illetve *házi lúd* spermiumok programozott mélyhütési eljárással és ultragyors technikákkal - pellet-módszer és nitrogéngőzben történő mélyhütés - történő tartósításának összehasonlítása és fejlesztése, törekedve az egyes fajok számára gyakorlati szempontból legideálisabb protokollok kidolgozására.
- Munkám célja a *házi tyúk korai ivarszerv-szöveiteinek* ultragyors technikákkal - nitrogéngőzben történő mélyhütés, pellet-módszer, illetve vitrifikációs eljárás- történő mélyhütése. A mélyhütési protokollok eredményességének *in vitro* - szövettani és szövettenyésztési - eljárásokkal történő összehasonlítása.

2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

2.1. A madarak szaporodásbiológiai sajátosságai

A madarak szaporodásbiológiája számos tekintetben eltér az emlősökétől, mely magyarázatot adhat az ondómélyhűtés, valamint a mesterséges termékenyítés - emlős fajokhoz viszonyított - alacsonyabb hatékonyságára. Mivel e sajátosságok ismerete feltétlenül szükséges a fenti technikák megfelelő alkalmazásához, ezért fontosnak tartom a madarak emlősöktől eltérő szaporodásbiológiai sajátosságainak rövid bemutatását.

2.1.1. A nőivarú madarak szaporodásbiológiai sajátosságai

A nőivarú madarak esetében az embrionális fejlődés során a jobb oldali petefészek fokozatosan visszafejlődik, így ivarérett nőivarú madarakban - pár kivételtől eltekintve (kivi, egyes sólyom- és héjafélék, sasok, keselyűk) - csak a bal oldali petefészek, valamint a bal petevezető aktív funkcionálisan. A madár-petevezető másik sajátossága a spermiumtárolási képesség, aminek köszönhetően a természetes párzás, illetve a mesterséges termékenyítés és a petesejt megtermékenyülése között sokkal hosszabb idő telik el, mint emlősök esetében. Míg az emlősöknél a párzást, illetve a termékenyítést követő 24-72 órával megtörténik a megtermékenyülés, addig madarak esetében 10-40 nap is eltelhet a párzás és a gaméták fúziója között (*Péczely, 2013*) a madár-petevezető uterovaginális és infundibuláris szakaszában található spermiumtároló tubulusok jelenléte miatt. A petevezető vaginális része - eddig még minden részletében nem tisztázott módon - fontos szelekciós mechanizmussal rendelkezik, melynek révén csak az ún. fitt, intakt és funkcionálisan is ép spermiumok tárolódnak, ami a bejutott spermiumok csupán 1-2%-a (*Bakst et al., 1994*). Az így elraktározott spermiumok szakaszosan ürülnek, tyúkfaj esetben naponta kb. 30% (*Brillard, 1993*). A spermiumtároló tubulusok száma és spermiumtároló kapacitása eltér az egyes fajokban. Míg tyúk fajban 5000, addig pulykában 30000 tubulus található (*Bakst et al., 2010*), többek között ezzel is magyarázható, hogy a fertilis periódus a pulyka esetében jóval hosszabb, mint a tyúknál (4-6 hét vs. 2 hét). A tojók spermiumtároló képességét azonban nagyban befolyásolja az életkor is. Igazolódott ugyanis, hogy a termelési periódus második felében egyrészt felgyorsul a spermiumtároló csövecskék ürülése, másrészt a spermiumtároló tubulusok tárolókapacitása is csökken, mindez a fertilis periódus hosszának rövidülését okozza (*Brillard, 1993*).

2.1.2. A hímivarú madarak szaporodásbiológiai sajátosságai

A hímivarban is számos különbség létezik az emlősökhöz képest. A hasüregben, a vesék alatt, testhőmérsékleten (38-39°C-on) funkcionáló heréket nem tagolják sővények lebenyekre, állományukat a kanyarulatok csatornácskák és az interstitiális kötőszöveti állomány alkotja. Az emlősökkel ellentétben a kanyarulatok csatornácskák nem vakon végződnek, hanem csőhálózatot képeznek. A mellékherének madarak esetében nincs jelentős szerepe a spermiumtárolásban és a maturációban (*Péczely, 2013*), ezt a funkciót az ondóvezető látja el. A heréből kikerülő spermiumok 90%-a raktározódik itt, míg csak a fennmaradó 10% a mellékherében. Az érett ondósejtek madarak esetében sokkal rövidebb ideig tárolódnak. Japán fűrj esetében csupán 1-2 napig, míg pl. patkány esetében az optimális tárolási idő 9 nap (*Clulow és Jones, 1982*). A spermatogén sejtek fejlődése, a spermatogenezis során a madarak hímivarsejtjei 10 stádiumon mennek keresztül, míg emlősökben 14 stádium alkot egy ciklust (*Aire, 2007*). A spermiogenezis időtartama jelentősen rövidebb, mint az emlős fajoknál. Míg a spermatogoniumok spermiummá alakulása a kérődzőknél 49 napig tart, addig kakasban ez a folyamat kb. 12 nap alatt lezajlik (*Wolfné Táskai, 2000*). A spermiumok morfológiája is eltér az emlősökétől, leginkább a hüllőkéhez hasonlít, miszerint a nyaki rész kevésbé kifejezett, a fej és a középdarab egyszerűen kapcsolódik (*Péczely, 2013*).

A megtermékenyülést megelőző kapacitáció és az azt követő akroszóma-reakció madarak esetében sokkal gyorsabban játszódik le, ezért nehezebben vizsgálható, a mechanizmus még nem teljesen tisztázott. Ami biztos, hogy a madár spermiumoknak nincs szükségük több órás érési folyamatra és az emlősökhöz hasonló kapacitációra (*Olsen és Neher, 1984*). Ezt bizonyítja, hogy közvetlenül a kakas heréjéből nyert spermiumok, jóllehet még nem motilisak, mégis termékenyítőképesek *in vitro*, illetve *in vivo* is, ha a petevezető magnum vagy infundibulum részébe inszemináljuk azokat (*Howarth, 1971*).

2.1.3. Megtermékenyülés és embrióelhalások

Madarak esetében a megtermékenyülés mechanizmusa is eltér az emlős fajoknál tapasztaltakkal. Míg az emlősöknél a termékenyülés monospermiás, azaz egyetlen spermium hatol be a petesejtbe, addig a madaraknál polispermiás termékenyítés figyelhető meg. Ennek értelmében több spermium hatol be a petesejtbe, azonban csak egyetlen, a csírákorong közepén merőlegesen érkező spermium fuzionál a petesejttel (*Péczely, 2013*). A többi spermium funkciója, melyek még a petesejtbe hatolnak, egyelőre ismeretlen. *Boerke és munkatársai (2007)* humán embriogenezis tanulmányozása során jutottak arra a megfigyelésre, miszerint a petesejtbe

került spermiumokból származó RNS-ek egy része olyan gének működését befolyásolja, amelyek a korai embrionális fejlődés során aktívak. Elképzelhető, hogy hasonló mechanizmusnak lehet szerepe a madárembrió korai fejlődésében is, ami még kifejezettebb lehet a polispermia esetén. Más vélemények szerint viszont csupán azért van szükség polispermias termékenyítésre, hogy a hatalmas méretű petesejt megtermékenyülésének nagyobb legyen az esélye (*Wishart, 1999*). Annyi bizonyos, hogy a normális embriófejlődéshez szükséges egy adott spermiumszám. Igazolt, hogy mind a túl kevés (*Christensen et al., 2005*), mind a túl sok (*Van Krey et al., 1966*) petesejtbe jutott spermium korai embrióelhalásokhoz vezet.

Mivel vizsgálatainkban az embrióelhalások és a mélyhűtött ondóval történő termékenyítések összefüggéseit is tanulmányoztuk, szükségesnek tartom az embrióelhalások madarakra jellemző sajátosságait is bemutatni. Az embrióelhalások két nagy csoportba sorolhatók: *az inkubáció előtt*, illetve *az inkubáció alatt* történő elhalásokra. Az inkubáció előtt történhet elhalás nagyon korán, még az ovipozíció előtt, azaz amikor a tojás még a petevezetőben tartózkodik. Ebben az esetben valójában a sejtosztódás megindulásának a tényét lehet megállapítani, azaz a termékenyülés megtörténtét. Ismert, hogy az infundibulumban történő megtermékenyülést követően a két pronucleus fúziója csupán kb. 4 órával az ovulációt követően zajlik le, amikor a tojás már a magnum és az ishtmus határához ért és a tojásfehérje is ráakódott. Ekkor kezdődik el az embrió barázdálódása és az itt eltelt 21 óra alatt, amíg a meszes héj a tojásra rakódik, az embrió egy kb. 40-60 ezer sejtes blasztocóra állapotban jut el. Ez a nagyon korai embrióelhalás az embriófejlődés I-VI. stádiumában (*Eyal-Giladi és Kochav, 1976*) következik be, amely speciális festési eljárással kimutatható (*Liptói et al., 2004*). Szintén az inkubációt megelőző időszakban - a tojások tárolása alatt - is bekövetkezhet az embriók elhalása, elsősorban a helytelen tárolás következményeként.

Az inkubáció alatt történő embrióelhalások nagyobb része az első 4-5 napban, majd a kelést megelőző időszakban történik, kisebb része a keltetés középső időszakában. Mind a korai mind a később bekövetkező embrióelhalásokat genetikai és keltetéstechnológiai problémák is okozhatják. A lámpázás során normális embriófejlődést nem mutató tojások feltörésénél az 1-5 napos kori elhalások azonosíthatók, míg az ún. véresnek lámpázott tojások feltörése után az elhalt embrió pontos fenotípusa szabad szemmel történő vizsgálattal meghatározható (*Liptói et al., 2004*).

A madarakra jellemző - korábban említett - petevezetőben történő szigorú szelektív mechanizmus, valamint a hosszabb spermiumtárolás egyaránt megnehezíti az asszisztált reprodukciós technológiák alkalmazását. A mesterséges termékenyítés, különösképpen a mélyhűtött ondóval történő inszeminálás alkalmazásakor az eljárás hatékonyságának növelése

érdekében feltétlenül szem előtt kell tartanunk a fent ismertetett szaporodásbiológiai sajátosságokat.

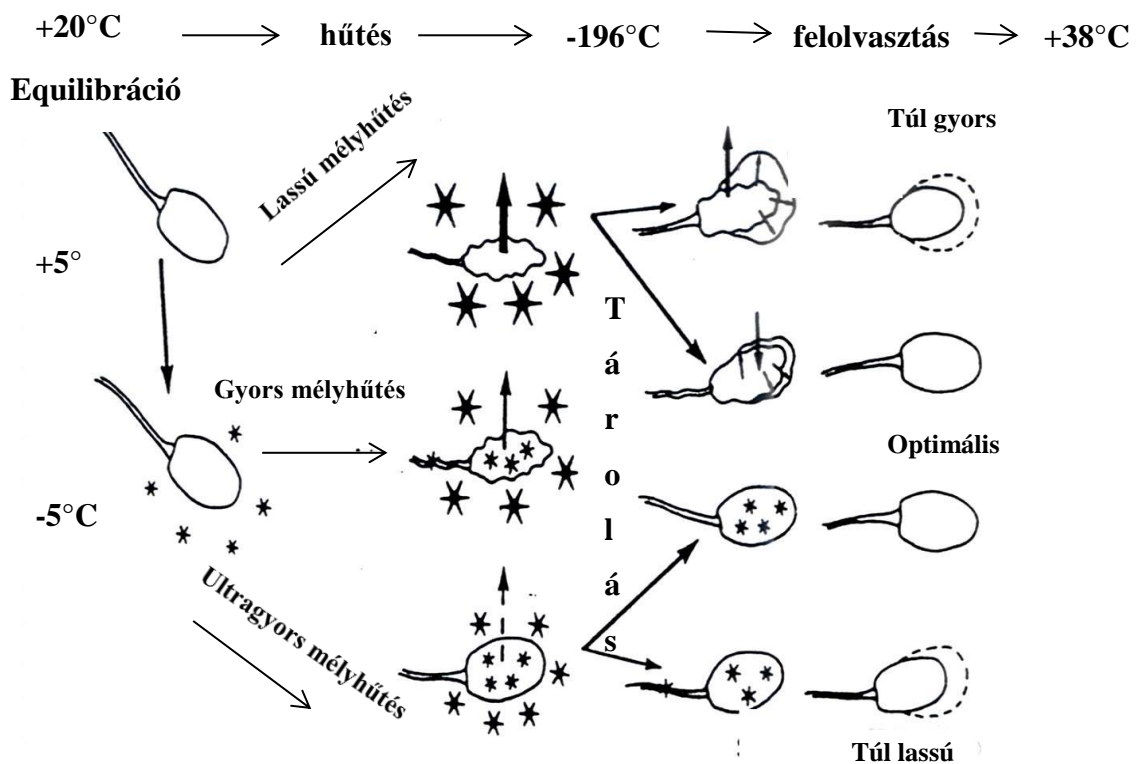
2.2. Az ondómélyhűtés folyamata és a mélyhűtési eljárások

A különböző mélyhűtési eljárások bemutatása előtt elengedhetetlennek tartom a mélyhűtés folyamata alatt bekövetkező biológiai változások áttekintését.

2.2.1. A mélyhűtés folyamata

A víz halmazállapot-változása és ennek biológiai hatása a kriobiológia alapja (*Liu et al., 2013c*). A mélyhűtési folyamat során a sejtek jelentős stressznek vannak kitéve (*Amann és Pickett, 1987; Hammerstedt et al., 1990*), mivel a krioprotektáns alkalmazása, a térfogatbeli változások és a hiperozmotikus körülmény miatti membránfeszülés, illetve sejtsugorodás, a mélyhűtés miatti dehidratáció, valamint az intracelluláris jégkristályképződés egyaránt stresszt okoz a spermiumoknak (*Parks és Graham, 1992*). Ismert, hogy a mélyhűtést követő szerkezeti károsodás során elsősorban a sejtmembrán és a sejt szervecskék membránja, másodsorban a spermiumok középdarabjában levő mitokondrium-gyűrű és az akroszóma sérül (*Harris et al., 1973*). A plazmamembrán, mint féligáteresztő hártya egyes molekulákat (vízmolekulák) gyorsan, más molekulákat (enyhén poláros molekulák, pl. glicerol) lassabban, míg bizonyos molekulákat (ionizált sók, poláros, ill. nagy molekulák) egyáltalán nem enged át. Az oldott molekulák kiegyensúlyozatlan eloszlása miatt a sejt külső és belső tere között ozmotikus nyomáskülönbség lép fel, amely az oldószer ki-, ill. beáramlásához vezet mindaddig, amíg a koncentrációkülönbség ki nem egyenlítődik. Ha az extracelluláris térben az oldott anyagok koncentrációja megnő, akkor az intracelluláris térből oldószer kiáramlás történik és a sejt zsugorodni kezd, mely a sejt dehidratációjához vezet. Ezzel az intracelluláris jégkristályképződést csökkenteni tudjuk. Természetesen az extracelluláris tér oldószertúlsúlya esetén ellentétes folyamatok játszódnak le és a sejt az oldószer beáramlás miatt megduzzad. A felolvasztási procedúra során ez a vízbeáramlás a membrán sérüléséhez vezethet (*Holt, 2000*). A mélyhűtés folyamán két szakaszban zsugorodnak össze a sejtek: először a krioprotektáns hozzáadásakor, majd a folyékony-szilárd átalakulás alatt (*Hammerstedt, 1995*). A mélyhűtés során különböző típusú sérüléseket szenvednek a sejtek az egyes hőmérsékleti tartományokban. A +15°C és -5°C közötti tartományban azok a fagyási sérülések a dominánsak, melyek során a citoplazma zsírcseppjei és mikrotubulusai irreverzibilisen sérülnek (*Leibo et al., 1996*). A mélyhűtés legkritikusabb pontjának a 0°C és -5°C közötti hőmérsékleti tartományt tekintjük, amikor elsősorban

extracelluláris jégkristályok képződnek (Buss, 1993). Ezt követően -5°C és -80°C között - jóllehet intra-, ill. extracelluláris jégkristályok is keletkeznek - ezek döntően reverzibilis sérüléseket okoznak. A -150°C alatti hőmérsékleti tartomány a mélyhűtés legkevésbé veszélyes fázisa (Vajta és Nagy, 2006). A különböző hűtési sebességek esetén eltérő ütemben történik a vízkiáramlás az egyes mélyhűtési eljárások során (1. ábra) (Hammerstedt et al., 1990). Lassú mélyhűtés esetén a sejteken kívül nagy jégkristályok képződnek, melynek hatására a sejtől víz áramlik ki, így a sejtekben nem (vagy csak nagyon kevés) jégkristály képződik. Egyes vélemények szerint a túl gyors hűtési sebesség esetén nincs elég idő a vízkiáramlásra, így az intracellulárisan képződött jégkristályok miatt a sejtek irreverzibilisen károsodnak (Amann és Picket, 1987). Morris és munkatársai (2012) szerint azonban ultragyors hűtés esetén, a sejten belüli folyadék vitrifikálódik, így nem történik intracelluláris jégképződés, ezért a spermiumok károsodását sem a jégképződés, hanem a felolvasztásnál fellépő ozmotikus egyensúlyhiány okozza.



1. ábra: A mélyhűtés folyamata (Hammerstedt et al., 1990)

2.2.2. Krioprotektív anyagok

A krioprotektánsok olyan vegyületek, melyek a mélyhűtés során mérséklik a sejtmembrán károsodását, a spermiumban lévő vízmolekulákkal és membránjának lipidmolekuláival kölcsönhatásba lépve befolyásolják a sejtmembrán áteresztőképességét (*Hammerstedt és Graham, 1992*). A krioprotektív anyagokat alapvetően két nagy csoportba sorolhatjuk aszerint, hogy a sejtbe bejutva vagy azon kívül fejtik ki védőhatásukat. Eszerint megkülönböztetünk kis molekulású, penetráló, ún. intracelluláris, illetve nagy molekulású, nem penetráló, ún. extracelluláris krioprotektánsokat. A penetráló védőanyagok az ozmózis nyomáskülönbségből adódóan a sejt belsejéből eltávolítják a vizet, egyúttal csökkentik az oldat fagyáspontját, ezáltal minimalizálják a jégkristályképződést, míg a nem penetráló krioprotektánsok az intercelluláris térben dehidratációt okozva védik a sejteket. Védőhatásuk mellett azonban számolni kell ezen anyagok negatív hatásaival (toxicitás, ozmotikus kártétel) is (*Vajta és Nagy, 2006*). Az egyes baromfifélék spermiumai eltérő krioprotektánsokat preferálnak. A penetráló védőanyagok közül tyúkféléknél leggyakrabban a glicerolt, míg pulyka esetében a dimetil-szulfoxidot (DMSO) (*Sexton, 1981*), vízi szárnyasoknál a dimetil-acetamidot (DMA) (*Schramm és Hübner, 1989*) és a dimetil-formamidot (DMF) (*Łukaszewicz, 2001*) találták a leghatásosabbnak. Az extracelluláris védőanyagok közül elsősorban a nagy molekulatömegű polimereket és cukrokat, úgymint a szacharózt (*Surai és Wishart, 1996*), a trehalózt (*Terada et al., 1989*), a polyvinylpirrolidint (*Lake et al., 1981*) és a metilcellulózt (*Phillips et al., 1996*) alkalmazzák leggyakrabban krio-, ill. ozmoprotektánsként. Mivel a nem penetráló krioprotektánsok önmagukban nem nyújtanak kellő védelmet a mélyhűtéssel szemben, ezért általában más intracelluláris védőanyaggal kombinálva célszerű alkalmazni ezeket (*Holt, 2000*).

Madarak esetében a penetráló krioprotektánsok közül leggyakrabban használt glicerol alkalmazása során kiderült, hogy számolni kell annak kontraceptív hatásával (*Neville et al., 1971*), ezért az inszeminálás előtt a felolvasztott ondómintából el kell távolítani, illetve végkoncentrációját 2% alá kell csökkenteni (*Lake, 1968a*). *Sloviter (1951)* alkalmazta először a glicerol dialízissel történő eltávolítását humán vörösvértesteknél, mely alapján *Shaffner (1964)* komplett ondómélyhűtési protokollt dolgozott ki tyúkfélék hímivarsejtjeinek tartósítására. A dialízis mellett a glicerol eltávolítható a minták glicerolmentes hígítóval tízszeres mennyiségre történő hígítását követő centrifugálással is (*Lake et al., 1981*), azonban mindkét procedúra tovább károsítja a spermiumokat (*Polge, 1951*), így csökkenti az ondóminták termékenyítőképességét (*Steel és Wishart, 1996*).

A mélyhűtött/felolvasztott ondósejtek morfológiája alapján - elsősorban az akroszóma és a középdarabot vizsgálva - az alkalmazott krioprotektánsok hatékonysága szerint házityúk-faj

esetében az alábbi rangsor állítható fel: glicerol > etilén-glikol (EG) > dimetil-szulfoxid (DMSO) > metil-formamid (MF) (Maeda et al., 1984). Számos vizsgálat egyhangúan állítja (Masuda et al., 1974; Tselutin et al., 1999), hogy a glicerol a leghatékonyabb, míg a DMSO a legtoxikusabb a felsorolt krioprotektáns anyagok közül, azonban a korábban már említett kontraceptív hatás miatt a glicerol eltávolítása sok hátránnyal jár. Az eltávolítási procedúra ozmotikus sokkot és egyéb fizikai károsodásokat okoz a spermiumokban (Polge, 1951), tovább gyengítve azokat, emiatt fontos egyéb, alternatív krioprotektánsok alkalmasságát vizsgálni.

2.2.3. Ondómélyhűtési eljárások technikái

Az egyes mélyhűtési eljárások elsősorban a hűtés, illetve a felolvasztás sebességében, valamint az ondótárolás módjában különböznek egymástól.

Az **ondó tárolása** történhet kriocsőben (Lake et al., 1981; Wishart, 1995), műszalmában (Duplaix és Sexton, 1984; Seigneurin és Blesbois, 1995), illetve pellet formájában (Terada et al., 1989; Kurbatov et al., 1984; Tselutin et al., 1995). Bellagamba és munkatársai (1993) szerint a műszalma alkalmazása eredményesebb a kriocsőnél, de saját tapasztalataink szerint tyúk- és lúdfaj lassú ondómélyhűtése esetében a kriocsöves tárolás magasabb túlélést eredményez, mint a műszalmás (Barna et al., 2008, 2010).

A **hűtési sebesség** szempontjából megkülönböztetjük a lassú, különböző hűtési ütemben végzett programozott, a gyors nitrogéngőzös, illetve az ultragyors pellet-módszert, továbbá a vitrifikációs eljárást. A programozott eljárás esetében az ondómélyhűtés egy programozható mélyhűtő berendezésben történik, így a hűtés sebessége folyamatosan kontrollált. A nitrogéngőzös technikánál a műszalmákat vagy a kriocsöveket nitrogéngőz felett hűtjük, a hűtés sebessége a nitrogénszinttől való távolságtól függ, így nehezen kontrollálható. A pellet-módszernél közvetlenül a folyékony nitrogénbe vagy szárazjég-tömbre (konvencionális gyors hűtés) csepegtjük a hígított ondómintát. Napjainkban egyre gyakrabban alkalmazzák az ún. vitrifikációs eljárást, mely során a nagyon kis ondómennyiséget ultragyors hűtési sebességgel hűtik. A módszer lényege az oldat alacsony hőmérsékleten történő üvegszerű megszilárdulása jégkristályképződés nélkül. A folyamathoz extrém mértékben növelni kell a viszkozitást, és a hűtési sebességet, 2500°C/perc sebességtől (Palasz és Mapletoft, 1996) 6420°C/perc sebességen át (Rall, 1987), akár 600000°C/perc sebességig (Nawroth et al., 2002). Ennek érdekében nagy mennyiségű krioprotektánst tartalmazó vitrifikációs oldatot kell használni és extrém mértékben csökkenteni a lehűtendő minta mennyiségét, ami egyetlen petesejt, illetve korai osztódó stádiumban levő embrió esetén viszonylag könnyen megvalósítható (Vajta, 2000). A vitrifikációs eljárást nehezíti, hogy egy megbízható rendszerrel maximalizálni kell a hűtési sebességet,

ugyanakkor minimalizálni kell a magas krioprotektáns tartalom okozta toxikus, illetve ozmotikus hatást (*Vajta és Nagy, 2006*). Mindez a spermiumok esetében nehezebben megvalósítható procedúra, ugyanis itt mindig több százmillió sejtet tartalmazó sejtszuspenzió ultragyors fagyasztásáról van szó. Itt kell megjegyeznünk, hogy az ondómélyhütéses szakirodalomban egyre gyakrabban találkozhatunk a vitrifikációs eljárás megnevezéssel olyan esetekben is, mely valójában a fent leírtaknál nagyobb ondómenyiséget, következésképp lassúbb hűtési sebességet használ. Az extra gyors hűtés során a folyékony nitrogénbe közvetlenül becseppentett minta pellet (gömb) formát vesz fel, melynek a térfogata (5-15-25 vagy akár 50 μ l) a meghatározó abban, hogy egyszerűen ultragyors hűtésről vagy már vitrifikációról beszélünk (*Taylor, 2004*).

A mélyhűtés csak az egyik része a sikeres kriokonzerválásnak, míg a hatékonyság érdekében legalább ilyen fontos a mélyhűtött sejtek felolvasztása. A lassú hűtési rátával mélyhűtött sejtek esetében a felolvasztás során lejátszódó folyamat a mélyhűtési procedúra tükörképe. Általánosságban kijelenthető, hogy a lassan mélyhűtött sejteket lassan kell felolvasztani, míg a gyors eljárással mélyhűtött sejtek gyorsabb felolvasztást igényelnek (*Mazur, 2004*). A mélyhűtött ondóminták felolvasztása történhet alkohol- (*Lake et al., 1981*) vagy vízfürdőben (*Terada et al., 1989; Phillips et al., 1996*), de a pellet-módszer esetében adott hőmérsékletre beállított speciális felolvasztó készülékkel (*Tselutin et al., 1999; Váradi et al., 2013*) is.

A fenti rövid áttekintésből láthatjuk, hogy a mélyhűtéses tartósítás eredményessége számos tényezőtől függ. Az adott faj számára ideális ondóhígító, krioprotektáns, tárolási mód, valamint a hűtési,- ill. felolvasztási sebesség együttes alkalmazása a sikeres konzerválás kulcsa.

2.3. A madár hímvarsejtek mélyhűtéses tartósítása

Shaffner és munkatársai (1941) beszámolója szerint a baromfifélék hímvarsejtjének mélyhűtésére először az 1939-ben *Nelson* irányításával történtek sikertelen kísérletek, majd 1941-ben végeztek először ondómélyhűtést, mely során kakas-spermiumokat tartósítottak -76°C -on széndioxid-alkohol keverékével, fruktózt használva krioprotektánsként. Egy év múlva már mélyhűtött/felolvasztott spermiumokkal termékeny tojásokat produkáltak (*Shaffner, 1942*). Ezzel párhuzamosan *Polge és munkatársai (1949)* átfogó vizsgálatokat folytattak több faj ondójával, melyek során fruktózt használtak védőanyagként. Az igazi fellendülés azonban egy véletlennek köszönhető, amikor *Polge* kutatásai során (*1951*) felfedezte a glicerol hatékony krioprotektív tulajdonságát. Valójában a kriobiológiai kutatások ezzel a felfedezéssel vették kezdetüket. Ezt követően egyre több kutatócsoportban folytattak - elsősorban emlős sejtek - mélyhűtését célzó kutatásokat, míg baromfispermiumokkal kapcsolatos vizsgálatok csak a 80-as években indultak

el intenzívebben, melyekről számos áttekintés beszámol (*Graham et al., 1984; Lake, 1986; Bellagamba et al., 1993; Hammerstedt, 1995; Surai és Wishart, 1996; Blesbois, 2006*). A kutatások során bebizonyosodott, hogy a madár spermiumok sokkal érzékenyebbek a mélyhűtésre, mint az emlős fajok hímvarsejtjei, továbbá a mélyhűtött spermiumok termékenyítőképessége is jóval alacsonyabbnak bizonyult, mint az emlősöknél (*Long, 2006*). A mélyhűtött ondó termékenyítőképessége a friss ondónak csupán 1,6%-a (*Wishart (1985)* szerint, melynek háttérében a madárspermium eltérő membránszerkezete és a madarakra jellemző élettani és szaporodásbiológiai különbségek állnak. Ezek közül kiemelendő a - korábban már említett - spermiumtároló tubulusok szerepe, melyekben szigorú szelekció eredményeképpen csupán a spermiumok 1-2%-a rakódik be az inszeminálást követően (*Bakst et al., 1994*). Eltérően az emlősöktől, ahol a mélyhűtött/felolvasztott spermiumnak csak néhány órát kell életben maradnia a termékenyítésig, a madarak petevezetőjében tárolódó spermiumoknak a mélyhűtést követően akár 1 héttel is képesnek kell lennie termékenyítésre.

Az egyes mélyhűtési protokollok kidolgozásánál és alkalmazásánál szem előtt kell tartani, hogy a különböző baromfifajok más-más ondóhígítót, hűtési rátát és krioprotektánst igényelnek, vagyis a sikeres mélyhűtési módszer fajspecifikus (*Holt, 2000*). Emellett eltérő az egyes baromfifajok mélyhűtéssel szembeni toleranciája is. Két biofizikai tényező - a spermiumok ozmotikus stresszel szembeni ellenállóképessége és a membrán-fluiditása - hozható kapcsolatba az egyes baromfifajok mélyhűtéssel szembeni eltérő toleranciájával (*Blanco et al., 2000; Blesbois et al., 2005*). A gyöngytyúk-spermiumok a biokémiai és biofizikai tulajdonságaiknak köszönhetően kevésbé tolerálják a mélyhűtést, mint a házityúk-, ill. a pulyka-hímvarsejtek. A faj hímvarsejtjeinek alacsonyabb membrán-fluiditása és a magasabb koleszterol-foszfolipid aránya csökkenti a sejtmembrán rugalmasságát, ezáltal csökkentve a mélyhűtést/felolvasztás utáni túlélési képességüket (*Seigneurin et al., 2013*), ezért a galliform fajok közül a legnehezebben mélyhűthető spermiumok közé sorolhatjuk.

2.3.1. A házi tyúk spermiumainak mélyhűtéses tartósítása

Lake és Stewart (1978) nevéhez fűződik az első valóban sikeres ondómélyhűtés kidolgozása házi tyúk (*Gallus domesticus*) spermiumoknál, mely során lassú hűtési ráta és glicerol alkalmazásával, 0,15 ml spermium bejuttatásával egyszeri inszeminálással 80%-os termékenységet értek el. Míg *Tajima és munkatársai (1990)* csak 44%-os, addig *Gill kutatócsoportja (1996)* 65%-os termékenységet tudott produkálni a glicerolos mélyhűtéssel. Ugyancsak lassú mélyhűtési protokollt fejlesztett ki *Sexton (1980)*, azonban krioprotektánsként 4% DMSO-t használt, mellyel 50%-os termékenységet ért el. A fenti módszer alkalmazásával

Williamson és munkatársai (1981) 45%-os termékenységet produkáltak. Mindkét programozott módszert optimalizálta a 1990-es években *Seigneurin és Blesbois (1995)*, valamint *Van Voorst és Leenstra (1995)*. Míg a francia kutatócsoport 11% glicerol használatával 76%-os termékenységet (*Seigneurin és Blesbois, 1995*), addig a holland kutatók 4,5% DMSO-val 82-90%-os termékenységet értek el (*Van Voorst és Leenstra, 1995*). *Hübner és Schramm (1988)* egyaránt 5,6% EG-t, illetve DMA-t használtak kakas spermiumok mélyhűtéséhez, így 55-64% közötti termékenységet értek el a mesterséges termékenyítést követően. *Tereshchenko munkatársaival (1992)* szintén programozott módszert alkalmazva, 7% DMF-ot használva 75-85% termékenységet ért el létrehozva egy olyan módszert, mely elősegítheti az ukrán baromfi génbank felállítását. *Santiago-Moreno és munkatársai (2011)* a spanyol baromfi génbank létrehozásához igyekeztek hatékony ondómélyhűtési protokollt kidolgozni. Vizsgálataik során megállapították, hogy se az egyensúlyozási időnek, se a hűtési rátának nincs hatása a termékenyítő-képességre, azonban a lassú mélyhűtési sebesség nem ajánlott DMA alkalmazása mellett. Egy másik spanyol kutatócsoport a francia kutatók által optimalizált programozott mélyhűtési eljárást kívánta fejleszteni a glicerol koncentrációjának csökkentésével. Annak ellenére, hogy felolvasztás után a 8% glicerolos protokoll produkálta a legjobb ondóminőséget, a termékenységi eredmények (23-30%) az összes protokoll esetében (4,6,7, ill. 8% glicerol) hasonlóan alakultak (*Blanch et al., 2014*).

A programozott eljárással párhuzamosan a 90-es években kifejlesztettek egy gyors mélyhűtési eljárást, az ún. pellet-módszert, mely során a hígított ondómintát közvetlenül folyékony nitrogénbe cseppentették 6% DMA-t használva krioprotektánsként. A nagyon gyors hűtési sebességet alkalmazó 50 µl méretű pellet alkalmazásával *Tselutin és munkatársai (1995)* 93-94%-os termékenységet produkáltak a különböző baromfifajok vizsgálata során. *Zaniboni és munkatársai (2014)* a pellet-módszer optimalizálása során megállapította, hogy az alacsonyabb DMA koncentráció (6 vs. 9%) és a rövidebb egyensúlyozási idő (1 vs. 30 perc) szignifikánsan jobb motilitást eredményez a túlélő spermiumoknál. A módszer további optimalizálás után - mely szerint a tároláshoz pellet helyett műszalmát használtak a biztonságosabb azonosítás érdekében - 88%-os termékenységet eredményezett (*Woelders et al., 2006*) és a spermabanki tárolás referencia módszerévé vált a glicerolos mélyhűtés mellett. Míg előbbi módszert a Holland Nemzeti Génbank, addig az utóbbi glicerolos mélyhűtést a Francia Génbank alkalmazza (*Blesbois, 2006*). Továbbá a FAO is ezt a két módszert ajánlja házityúk-spermiumok mélyhűtési tartósítására (*FAO, 2012*).

Számos kísérletet végeztek egyszerűbb, a gyakorlatban könnyebben alkalmazható, mélyhűtési eljárásokat - pl. nitrogéngőzös módszer- tesztelve, mely során folyékony nitrogént tartalmazó polisztirol dobozban fagyasztják le nitrogéngőzben a mintákat. Kutatócsoportunk a

nitrogéngőzös eljárással 7% DMA-t használva 14%-os túlélést ért el az élő, normális morfológiájú spermiumokra vonatkoztatva (*Barna et al., 2008*). Egy japán kutatócsoport különböző krioprotektánsok (MA, DMA, DMF, DMSO) hatékonyságát tesztelte házi kakas nitrogéngőzös ondómélyhűtése során. A fenti védőanyagok közül legeredményesebbnek a 7,5% MA bizonyult, alkalmazásával 70%-os termékenységet értek el (*Hanzawa et al., 2006*), majd egy későbbi vizsgálat során 84%-os termékenységet is produkáltak a fenti módszerrel (*Sasaki et al., 2010*).

Napjainkban egyre gyakrabban előkerül a hímivarsejtek pellet-módszerrel (vitifikációs eljárással) történő mélyhűtéses tartósítása. Az ultragyors eljárás előnye, hogy a gyors hűtési sebességnek köszönhetően elkerülhető a jégkristályok képződése, ezáltal csökkenthető a sejtmembrán károsodása a mélyhűtés/felolvasztás során. A lassú, programozott és általuk vitifikációs eljárásnak nevezett módszert hasonlították össze egy afrikai tyúkfajta ondómélyhűtése során, védőanyagként 8% DMSO-t használva. Míg mélyhűtés/felolvasztás után a lassú módszerrel mélyhűtött spermiumok 43%-os, addig a vitifikációs eljárással tartósított spermiumok csak 2,5%-os motilitást mutattak (*Mphaphathi et al., 2012*). Kutatócsoportunk - francia kollégákkal együttműködve - tesztelte a vitifikációs eljárást baromfi fajok hímivarsejtjeinek mélyhűtésére, azonban a vizsgálataink során nem sikerült számottevő eredményt elérnünk. A pellet méretének 5 µl-re való csökkentésével is csak 10%-os túlélést tudtunk produkálni (*Barna et al., 2013*). A sikertelen kísérletek is mutatják, hogy spermiumok mélyhűtésére - a madarak esetében - eddig nem sikerült hatékony vitifikációs eljárást kidolgozni. Tudomásunk szerint az eddig vizsgált fajok közül csak humán (*Schulz et al., 2006; Isachenko et al., 2008*) és hal (*Merino, 2012*) spermiumok esetében tudtak 50% feletti felolvasztás utáni motilitást elérni. Jóllehet, utóbbi vizsgálatban a nagy pelletméret miatt megkérdőjelezhető a „vitifikáció” kifejezés.

Az elmúlt években szerzett tapasztalataink szerint a lassú, programozott módszerrel jobb túlélési arányt lehet elérni őshonos kakassperma mélyhűtésénél, de a nitrogéngőzben történő mélyhűtés is ígéretesnek tűnik a kakasspermium hosszú távú tartósítására (*Barna et al., 2008*). Szintén jobb termékenységet eredményezett a lassú, programozott mélyhűtés alkalmazása a német spermabank kialakítását célzó kutatásban. A fenti vizsgálatban 6,5% DMF és MA kombinációját használva 80% feletti termékenységet értek el (*Ehling et al., 2012*). Egy francia kutatócsoport a klasszikus glicerolos és a DMF-ot alkalmazó programozott eljárást, valamint a Tselutin-féle pellet-módszer eredményességét hasonlította össze. Míg a programozott eljárások 76% ill. 79%-os, addig a pellet-módszer 88%-os termékenységet produkáltak kakas spermiumok esetében (*Chalah et al., 1999*). A krioprotektánsok (8% glicerol, 3% DMA) és a mélyhűtési módszerek közötti összefüggést vizsgálták mediterrán tyúkfajtáknál. Kísérleteik során a pellet-

módszer (3% DMA) 25%-os, míg a glicerolos programozott mélyhűtés 29%-os termékenységet eredményezett (*Abouelezz et al., 2015*).

Eltérés lehet az egyes tyúkfajták mélyhűtéssel szembeni toleranciája között is. Egyes vizsgálatok szerint a díszbaromfi fajok ondóminősége és ondómélyhűtéssel szembeni ellenálló-képessége alacsonyabb, mint a hús,- ill. tojó típusú tyúkfajtáké. Ezt igazolja, hogy pellet-módszerrel történő mélyhűtés után 18-34% volt az élő, normális morfológiájú spermiumok aránya négy dísztyúk fajta vizsgálatakor (*Siudzińska és Lukaszewicz, 2008*).

2.3.2. A gyöngytyúk-spermiumok mélyhűtéses tartósítása

Az ún. honosult baromfifajunk, a magyar parlagi gyöngytyúk (*Numida meleagris*) hímivarsejtek mélyhűtéses tartósítását nehezíti, hogy az ondó minősége gyengébb (*Massip et al., 2004*), a spermiumok nagyon érzékenyek a mélyhűtésre és a mélyhűtés okozta sérülések következtében a túlélési arány, valamint a termékenység is meglehetősen alacsony. Ismert, hogy a gyöngytyúk spermiumok alacsonyabb membrán-fluiditása, valamint magasabb koleszterol-foszfolipid aránya csökkenti a membrán rugalmasságát, elsősorban emiatt csökken a spermiumok mélyhűtéssel szembeni toleranciája (*Blesbois et al., 2005*). Mivel a világban kevés helyen népszerű a gyöngytyúk fogyasztása, így tenyésztése, ezért ezzel a fajjal történő vizsgálatokat bemutató közlemények is csak gyér számban állnak rendelkezésre. Francia kutatók korábban kakas spermiumok mélyhűtésére alkalmas módszereket összehasonlítva arra következtetésre jutottak, hogy a gyöngytyúk hímivarsejtjeinek mélyhűtésére egy középgyors hűtési rátát (15°C/perc) alkalmazó mélyhűtési protokoll a legmegfelelőbb. A leghatékonyabb módszer során egy saját fejlesztésű (*Voronina et al., 1986*) hígítót és 6% DMF-ot használtak krioprotektánsként, mellyel csupán 20%-os termékenységet tudtak elérni (*Seigneurin és Blesbois, 2006*).

2.3.3. A pulykaspermiumok mélyhűtéses tartósítása

A pulyka (*Meleagris gallopavo*) hímivarsejtek az eddigi tapasztalatok szerint érzékenyebbek a mélyhűtésre, mint a házityúk-spermiumok (*Blanco et al., 2000*). A rosszabb mélyhűtéssel szembeni toleranciának is köszönhető, hogy kevesebb alkalmazható mélyhűtési módszer áll rendelkezésünkre a pulyka esetében. A legkorábbi vizsgálatok glicerol használatával csupán 20% körüli termékenységet eredményeztek a mélyhűtött/felolvasztott pulykaondóval történő inszeminálás után (*MacPherson et al., 1969; Oderkirk és Buckland, 1977*). Mások ugyanazt a glicerolos, programozott eljárást alkalmazva házityúk-faj esetében 55%-os, addig

pulykaspermiumok mélyhűtésénél csak 34%-os túlélést értek el (*Wishart és Palmer, 1986*). *Bakst és Sexton (1979)* szintén a két faj ondójának mélyhűthetőségét hasonlították össze, de 4% DMSO használata mellett. Míg a házikakas-spermiumok esetében 55%-os termékenységet értek el, addig a mélyhűtött pulykaondóval egyáltalán nem sikerült termékeny tojást produkálniuk. A kevésbé sikeres ondómélyhűtést kompenzálja, hogy a pulyka tojóknak - a tyúkokhoz képest hosszabb a fertilis periódusuk, ugyanis a spermiumtároló tubulusokból naponta csak a tárolt spermiumok 11%-a ürül ki szemben a tyúkoknál jellemző 30%/nap ürülési aránnyal (*Wishart és Hartley, 1998*). Ennek köszönhetően a mélyhűtött ondóval történő inszeminálások során elvileg ritkább termékenyítési gyakorisággal is érhetünk el termékenységet. Az elmúlt években *Blanco és munkatársai (2011)* különböző krio- és ozmoprotektánsokkal, lassú programozott eljárással mélyhűtött pulykaondó *in vitro* vizsgálata során megállapította, hogy a 18% DMA és az 5% trehalóz/szacharóz kombinációja eredményezi a legjobb motilitást (39%) a túlélő sejteknél. Ugyanez a kutatócsoport különböző hűtési és felolvasztási rátákat tesztelve azt tapasztalta, hogy a gyors hűtési ráta alacsony sejttúlélést eredményez pulykaspermiumok esetében (*Blanco et al., 2012*), mely megegyezett a korábbi tapasztalatokkal is, melyek során a gyors mélyhűtés 26%-os, míg a lassú hűtési ráta 50%-os termékenységet produkált (*Zavos és Graham, 1983*). Hasonló termékenységi eredményeket kapott *Schramm és Hübner (1988)* is, amikor egy lassú és egy gyors mélyhűtési protokoll, valamint a pellet-módszer hatékonyságát hasonlította össze. Míg a lassú hűtési sebesség 72%-os, addig a gyors mélyhűtés és a pellet-módszer csak 56, illetve 19%-os termékenységet eredményezett. Több kutatócsoport is alkalmazta a gyors pellet-módszert pulykaspermiumok mélyhűtésére, 71-84%-os termékenységet (*Tselutin et al., 1995*) valamint 42 %-os sejttúlélést (*Iaffaldano és mtsai, 2011*) produkálva. A nitrogéngőzös eljárást is tesztelték a faj hímvarsejtjeink tartósítására. A krioprotektánsként 6% DMA-t alkalmazó eljárás használatával 20%-os termékenységet értek el (*Long et al., 2014*).

2.3.4. A víziszárnyas-fajok spermiumainak mélyhűtési tartósítása

A gúnárondő megbízható mélyhűtési tartósításának nem csak génmegőrzési, hanem tenyésztői szempontból is nagy jelentősége van. A faj szaporodásbiológiai sajátosságaiból eredő nehézségekre (monogámia, a két ivar ivarsejtjeinek termelődése közti időbeni eltolódás) megoldást jelenthet a mélyhűtött ondóval való termékenyítés, ezért tenyésztők körében nagy az érdeklődés a gúnárondő sikeres mélyhűtése iránt. A szakirodalomban számos ondómélyhűtési próbálkozást találhatunk a lúd faj kapcsán. A korábban már említett pellet-módszerrel 57-77% közötti termékenységet értek el *Tselutin és munkatársai (1995)* kínai hattyúlúd (*Anser cygnoides*) ondómélyhűtése során. Egy másik ukrán kutatócsoport is 90% feletti termékenységet,

valamint 70% feletti kelési százalékot ért el a pellet-módszer alkalmazásával (*Sakhatsky et al., 1995*). Ezen eredmények reprodukálása azonban más kutatócsoportoknál nem járt sikerrel. *Tai és munkatársai (2001)* egy gyors, szárazjégen történő ondómélyhűtési protokoll és 9% DMA alkalmazásával 68-95%-os termékenységet ért el. *Lukaszewicz (2002)* az általa kifejlesztett programozott eljárással, 6% DMF és műszalma használata mellett szintén 90% feletti termékenységet produkált, valamint megállapította, hogy se a DMF jelenlétének, se a gúnarak életkorának nincs negatív hatása a termékenyítőképessegre (*Lukaszewicz, 2001*). Egy másik kísérletben igazolta, hogy pozitív korreláció van a friss, valamint a mélyhűtött/felolvasztott élő, normális morfológiájú spermiumok között, tehát a friss spermiumok jó minősége az eredményes ondómélyhűtés alapja (*Lukaszewicz et al., 2003*). Ugyanez a lengyel kutatócsoport a programozott eljárás további fajtára való adaptálása során megállapította, hogy a kisebb hígítási arány (2:1 vs. 1:1) esetében ellenállóbbak a spermiumok a kriosérülésekkel szemben, valamint a termékenység eredményessége elsősorban a mesterséges termékenyítés gyakoriságtól, valamint az inszeminált élő, normális morfológiájú sejtek számától függ (*Lukaszewicz et al., 2004*). Az utóbbi állítást támasztotta alá egy francia kutatócsoport, mely különböző mélyhűtési protokollokat hasonlított össze szürke landesi lúd génmegőrzése céljából. A többéves kísérlet végére a kezdeti 10%-os termékenységet a termékenyítési technika módosításával (gyakoribb termékenyítés, magasabb inszeminálási dózis) 60%-ra növelték (*Dubos et al., 2008*). Házi- és vadlúd fajták keresztezésével kívántak létrehozni hibrideket mélyhűtött ondóval való mesterséges termékenyítés alkalmazásával, melynek eredményeképpen 60%-os termékenységet tudtak elérni, valamint megállapították, hogy a rövidtávú tárolás (1 év vs. 1 hét) során nem romlik a mélyhűtött ondó minősége (*Kowalczyk és Lukaszewicz, 2012*). Kutatócsoportunk a lassú, programozott (módosított *Lukaszewicz*-féle módszer) és a gyors, nitrogéngőzben történő mélyhűtés *in vitro* eredményességét hasonlította össze gúnárondő esetében. Vizsgálataink szerint a lassú, programozott protokollal értünk el jobb túlélést (70% vs. 38%) melyben krioprotektánsként 7%-os DMF-et használtunk és műszalma helyett kriocsovékkel dolgoztunk. A nitrogéngőzben történt mélyhűtés a magasabb koncentrációjú (9%) DMF-fel hatékonyabb volt (52% túlélés), míg a programozott hűtésnél rosszabb eredményt (60%) produkált (*Barna et al., 2010*).

A kacsá ondómélyhűtésével kapcsolatban kevés tapasztalat áll rendelkezésünkre, egyes vélemények szerint a pézsmaréce (*Cairina moschata*) spermiumai érzékenyebbek a mélyhűtésre, mint a pekingi kacsá (*Anas platyrhynchos*) hímvarsejtjei (*Blesbois, 2007*). Egy német kutatócsoport lassú mélyhűtést alkalmazva 80%-os termékenységet ért el pézsmaréceénél (*Schramm és Hübner, 1989*), míg *Tselutin és munkatársai (1995)* egy programozott mélyhűtési eljárással, 5% DMA-t használva krioprotektánsként 75-83%-os termékenységet értek el pekingi

kacsánál. Módosított pellet-módszert alkalmazva hasonlították össze az egyes krioprotektánsok hatását pézsmaréce ondómélyhütése során. Míg a 7% DMSO 25%-os, addig az 5% glicerol 35% feletti motilis sejtarányt eredményezett (*Gerzilov, 2010*). Nitrogéngőzös középgyors mélyhütési eljárással is hasonló motilitási értékeket (4% DMSO-32%, 4% glicerol-35%) kaptak nyílfarkú réce (*Anas acuta*) ondómélyhütése során (*Penfold et al., 2001*). *Han és munkatársai (2005)* különböző hígítókat, krioprotektánsokat, egyensúlyi időket és felolvasztási hőmérsékleteket hasonlított össze nitrogéngőzös eljárást alkalmazva Jinding kacsá hatékony ondómélyhütésének kidolgozása érdekében. A leghatékonyabb módszerrel (IGGKP hígító, 10% DMSO, 15 perces egyensúlyi, 40°C-os felolvasztás) 39%-os termékenységet értek el.

2.3.5. Nem domesztikált madárfajok spermiumainak mélyhütéses tartósítása

A génmegőrzési célokat szem előtt tartva fontos megemlíteni, hogy a baromfifajok mellett számos nem domesztikált madárfaj ondómélyhütésével kapcsolatosan is folynak kutatások, mely fajok közül számos veszélyeztetett státuszban van. Veszélyeztetett fácánfajok pellet-módszettel történő ondómélyhütése során nagy különbséget tapasztaltak az egyes fajok spermiumainak túlélése között (1,3-24,9%). A mélyhűtött ondóval termékenyített tojók közül termékeny tojásokat produkáló tojók (12-ből 3 egyed) termékenysége átlagosan 85% volt (*Saint Jalme et al., 2003*). Galléros túzok (*Chlamydotis undulata*) spermiumok pellet-módszettel való mélyhütésével 100%-os termékenységi (6/6 termékeny tojás) és 50%-os kelési eredményt értek el (*Hartley et al., 1999*). Siketfajd (*Tetrao urogallus*) kakasok ondóvizsgálata igazolta, hogy jó minőségű, kevés plazmát tartalmazó ondójuk jól tolerálja a mélyhűtést. Szintén a pellet-módszer alkalmazásával 37%-os spermiumtúlélést és 80%-os termékenységet értek el (*Kowalczyk et al., 2012*). Darufajok génmegőrzési célból történő ondómélyhütésével kapcsolatban is számos kísérletet végeztek. Míg az 1980-as években kanadai daru (*Grus canadensis*) mélyhűtött ondójával programozott eljárással 4% DMSO használata mellett 25%-os (*Sexton és Gee, 1978*), majd később 50%-os termékenységet értek el (*Gee et al., 1985*), addig *Blanco és munkatársai (2012)* ugyanezzel a módszerrel később 74%-os termékenységet produkáltak. Egy korábbi kísérletben mélyhűtött hódaru (*Grus leucogeranus*) ondóval termékenyítettek amuri daru (*Grus vipio*) tojókat, így sikeresen hoztak létre fajhibridet, mely alátámasztotta a daru spermabank létrehozásának lehetőségét (*Maksudov és Panchenko, 2002*). Emu (*Dromaius novaehollandiae*) spermiumok nitrogéngőzös mélyhütése során 18% DMA-ot használva krioprotektánsként 51%-os élő, normális morfológiájú sejtarányt tapasztaltak a mélyhűtés/felengedés után (*Sood et al., 2012*). Egy indiai kutatócsoport szirti galamb (*Columba livia*) ondómélyhütésének kidolgozása közben megállapította, hogy a lassú, programozott módszer 8% DMSO-val kombinálva a

legalkalmasabb a faj spermiumainak mélyhűtésére. A fenti protokoll segítségével a motilis sejtek aránya felolvasztás után elérte a 40%-ot (*Sontakke et al., 2004*). Szintén DMSO-t (5%), azonban nitrogéngőzös eljárást alkalmazva Magellán-pingvin (*Spheniscus magellanicus*) ondómélyhűtése 45%-os motilis sejtarányt eredményezett (*O'Brien et al., 1999*).

A ragadozó madarak szaporodásbiológiai vizsgálatai során bizonyították, hogy egyes fajok (vándorsólyom, ibériai sas, szirti sas) spermiumai sokkal jobban tolerálják a hiperozmotikus körülményeket, mint a baromfifélék (tyúk, pulyka) hímivarsejtjei (*Blanco et al., 2000*). Ennek ellenére - valószínűleg a kis termékenyítési dózison köszönhetően - tarka vércse (*Falco sparverius*) programozott ondómélyhűtését követően 13,6% glicerol alkalmazásával csak 12%-os, míg 12,3% DMA-t használva 30%-os termékenységet tudtak elérni (*Brock és Bird, 1991*), a későbbiekben 10% DMSO-t használva krioprotektánsként 57%-os termékenységet produkáltak (*Gee et al., 1993*). Vándorsólyom (*Falco peregrinus*) faj glicerolos, programozott módszerrel mélyhűtött ondójával 33%-os termékenységet értek el (*Parks et al., 1986*).

A fenti áttekintésből látható, hogy nagy különbségek tapasztalhatók az egyes fajok spermiumainak ondómélyhűtés utáni termékenyítőképessége között az egyes laboratóriumokban. Annak ellenére, hogy a mélyhűtött/felolvasztott spermiumok túlélési aránya 40-50% körüli, az *in vitro* eredmények nem feltétlenül korrelálnak az *in vivo* - termékenységi - eredményekkel (*Donoghue és Wishart, 2000*). Hasonló tapasztalatunk van saját laboratóriumunk elmúlt 10 éves vizsgálatai alapján is. Ezzel szemben francia kutatók vizsgálatai szerint pozitív összefüggés van a felolvasztott élő, normális morfológiájú sejtek aránya, motilitása, membrán-fluiditása, valamint a termékenyítőképessége között. Véleményük szerint a gyakorlatban alkalmazott *in vitro* teszteknel a membrán fluiditásának vizsgálata a legalkalmasabb a mélyhűtött spermiumok termékenyítőképességének előrejelzésére (*Blesbois et al., 2008*). Mivel az ondómélyhűtés jelentősen csökkenti a termékenyítőképességet, ezért a mélyhűtött ondóval történő termékenyítéskor magasabb dózist és/vagy gyakoribb termékenyítést kell alkalmazni (*Williamson et al., 1981; Hammerstedt és Graham, 1992; Blesbois et al., 2008*). A friss kakas spermiumok inszeminálásánál alkalmazott 50-100 millió spermium helyett 500-700 millió spermium bejuttatására is szükség lehet a megfelelő termékenység eléréséhez (*Lake, 1986*). Kísérletek igazolták, hogy magasabb termékenyítési adag esetében (50 vs. 300 millió spermium) szignifikánsan magasabb termékenységet (20 vs. 59%) lehet elérni mélyhűtött kakasondóval is (*Sexton, 1976*). Még magasabb - 400-700 millió spermium- inszeminálási dózis alkalmazásával akár 90%-os termékenység is elérhető (*Van Voorst és Leenstra, 1995*). Ezzel szemben számos kutatás igazolta (*Bielefeldt, 1985; Ehling et al., 2012*), hogy a kétszeres termékenyítési dózis (360, illetve 600 millió spermium) alkalmazása nem javítja szignifikánsan a termékenységet. Saját korábbi tyúk fajon végzett vizsgálataink szerint az 50%-os termékenység eléréséhez min.

300 millió, míg az 50%-os keltethetőség biztosításához min. 400 millió élő, normális morfológiájú spermium inszeminálása szükséges (Végi *et al.*, 2005). A termékenyítési dózis meghatározásánál azonban figyelembe kell venni a mennyiségi korlátot. Egy korábbi ajánlás szerint (FAO, 1998) 600 millió spermiumot kell bejuttatni termékenyítésenként 60-100 µl mennyiségben. A dupla termékenyítési dózis (300 µl feletti mennyiség) jelentős spermavesztéssel járhat az inszemináláskor a vaginából történő spermiumelfolyás miatt (Sexton és Gee, 1978).

Egy fontos, napjainkban is aktuális kérdés, hogy a mélyhűtés során romlik-e a tárolt spermiumok minősége. Ez a spermabankok kialakításánál, illetve fenntartásánál komoly problémát jelenthet. Kowalczyk és Łukaszewicz (2012) gúnár spermiumok esetében megállapította, hogy egy éves tárolás alatt nem romlik a spermiumok minősége, nincs különbség az egy hétig, illetve egy évig tárolt ondó termékenyítőképessége között. Egy másik kísérlet igazolta, hogy kilenc évig mélyhűtve tárolt kakas ondóval felolvasztás után 47%-os termékenységet lehet elérni (Watanabe és Terada, 1980). Egy kísérletben a közel 20 évig tárolt és frissen mélyhűtött ondó minősége között nem találtak szignifikáns különbséget (Blackburn, 2006), azonban meg kell jegyeznünk, hogy a két mélyhűtési protokoll különbözött egymástól, tehát az összehasonlítás nem tekinthető objektívnek. Ezen probléma tisztázása mellett a madár hímivarsejtek mélyhűtéses tartósításával kialakított *in vitro* génbankok biztonságosabbá teszik az őshonos baromfifajok génmegőrzését, mintegy kiegészítve az *in vivo* állományok fenntartását.

2.4. Korai ivarszerv-szövetek mélyhűtéses tartósítása

Az *in vitro* génmegőrzés alternatív módja a korai ivarszerv-szövetek mélyhűtéssel való tartósítása és transzplantációja. Emlősök hereszövetének mélyhűtésével és transzplantációjával megoldható a termékenység megőrzése (Woods *et al.*, 2004; Pukazhenti *et al.*, 2006), az eljárás alkalmazásával kapcsolatban már régóta folynak kísérletek (Parkes és Smith, 1954). Hatékony mélyhűtési eljárást dolgoztak ki patkány (*Rattus norvegicus*) (Travers *et al.*, 2011), egér (*Mus musculus*), dzsungáriai törpehőrcsög (*Phodopus sungorus*), selyemmajom (*Callithrix jacchus*) (Schlatt *et al.*, 2002) hereszövetek mélyhűtésére. Emellett nyúl (*Oryctolagus cuniculus*) (Shinohara *et al.*, 2002), rhesus makákó (*Macaca mulatta*) (Poels *et al.*, 2012), valamint humán (Hovatta *et al.*, 1996) hereszövetek tartósításával kapcsolatban is végeztek kutatásokat. Sikeres mélyhűtési és transzplantációs eljárást dolgoztak ki halak hereszöveiteinek esetében is, melynek köszönhetően donor eredetű spermatogoniumokat azonosítottak a recipiens állatokban (Lee *et al.*, 2013).

Madarak esetében csak pár éve folynak korai ivarszerv-szövetek manipulációival kapcsolatos vizsgálatok. *Song és Silversides (2007a)* vizsgálatai igazolták, hogy a donor naposcsibe hereszövetének a recipiens madár bőre alá, ill. hasüregbe történő átültetésével donortól származó spermium nyerhető, melynek felhasználásával, a petevezető magnum szakaszába történő termékenyítéssel termékeny tojások állíthatók elő. Egy másik kutatócsoport (*Trefil et al., 2010*) vizsgálatai alapján - korábban gammasugárással sterilizált kakasok esetében - 9 héttel a transzplantáció után megkezdődik az átültetett here spermiumtermelése. A hereszövet mélyhűtése, mint alternatív génmegőrzési módszer lehetővé teszi a veszélyeztetett fajok esetében az értékes hímek genetikai állományának megőrzését.

Mivel az ondómélyhűtés csak a hímivar genetikai állományának megőrzésére alkalmas, ezért szükséges a petesejtekben tárolt női genetikai anyag megőrzésének kidolgozása, melyre a korai petefészekben található primer oocyták tartósítása megoldást nyújthat. Erre ad lehetőséget a naposkori petefészekszövetek tartósítása. A petefészek mélyhűtésére (*Deanesly, 1954; Parkes és Smith, 1954*) és transzplantációjára (*Parrot, 1959*) kezdetben szintén az emlős fajok esetében került sor. Az első mélyhűtött petefészek átültetése után született egér létrehozása *Parrot (1960)* nevéhez fűződik. Ezt követően laboratóriumi patkányokból (*Kagabu és Umezu, 2000; Wang et al., 2002*) és egerekből (*Gunasena et al., 1997a,b; Sztein et al., 1998; Choi et al., 2007; Liu et al., 2008; Kim et al., 2010*) származó korai petefészekszöveteken sikeresen hajtottak végre mélyhűtési tartósítást és átültetést. Emellett juh (*Gunasena et al., 1997b; Bordes et al., 2005*), szarvasmarha, sertés (*Gandolfi et al., 2006*), valamint humán petefészek (*Demeestere et al., 2007; Anderson et al., 2008; Isachenko et al., 2007; Keros et al., 2009; Silber, 2012*) mélyhűtésére is hatékony eljárásokat dolgoztak ki.

Bár házi tyúk petefészkének átültetésére már a 20. század elején történtek próbálkozások (*Gurthie, 1908; Davenport, 1911; Grossman és Siegel, 1966*), majd *Brard és Benoit (1969)* fürjjeccék petefészkének átültetésével is kísérletezett, azonban csak napjainkra sikerült hatékony módszert kidolgozni madarak petefészkének transzplantációjára (*Song és Silversides, 2006, 2007b; Kosenko, 2007; Song et al., 2012*). Kezdetben a hímivarsejtek mélyhűtésénél alkalmazott lassú, programozott protokollokat használták korai ivarszerv-szövetek mélyhűtésére, majd a későbbiekben egyre inkább előtérbe került a vitrifikációs eljárás alkalmazása.

A vitrifikációs eljárás során az egér petefészek darabokat tartalmazó kriocsőveket közvetlenül folyékony nitrogénbe dobták (*Migishima et al., 2003*). Ezzel a módszerrel hatékonyan lehetett vitrifikálni a petefészek darabokat relatíve kevesebb védőanyag hozzáadásával (*Chen et al., 2006*). Számos emlős faj pl. patkány (*Sugimoto et al., 2000*) és kecske (*Santos et al., 2007*) esetében alkalmazták a vitrifikációt petefészek mélyhűtésére. A módszer továbbfejlesztése során akupunktúras tűre szűrték fel - az egér és humán- petefészek

darabokat és azt közvetlenül folyékony nitrogénbe helyezték, ezáltal még gyorsabb hűtési sebességet értek el és csökkentették az így kevesebb krioprotektánst tartalmazó vitrifikációs oldat toxicitását (Wang *et al.*, 2008). Liu kutatócsoportja (2010) a lassú, programozott és a fenti vitrifikációs eljárás hatékonyságát hasonlította össze japán fürj (*Coturnix japonica*) petefészkek mélyhűtésénél. Tapasztalataik alapján a vitrifikációs eljárás minden szempontból (szövettan, tojástermelés, termékenység) eredményesebbnek bizonyult a petefészkek tartósítására. A vitrifikációval mélyhűtött petefészkek életképesebbek voltak, több morfológiailag normális tüszőt tartalmaztak és a recipiensek donor eredetű utódokat produkáltak (Liu *et al.*, 2010). Megállapították továbbá, hogy sem a fenti mélyhűtési eljárás, sem az átültetés nem befolyásolja negatívan a recipiens csibék növekedését és későbbi tojástermelését (Liu *et al.*, 2013a).

3. ANYAG ÉS MÓDSZER

3.1. Ondómélyhűtési kísérletek házityúk-fajban (*Gallus domesticus*)

Kísérletünkben a korábbi összefoglaló vizsgálataink alapján (Váradi *et al.*, 2013) legeredményesebbnek bizonyult mélyhűtési módszerek - standard glicerolos, programozott mélyhűtés és pellet-módszer- hatékonyságát *in vitro* és *in vivo* is értékeltük.

3.1.1. Kísérleti állatok és ondóvétel

Hús egyéves fogolyszínű magyar kakast (2. ábra) helyeztünk el egyedi ketrecekben. A spermadonor állatok hagyományos kakastápot fogyasztottak, önitatókból ittak *ad libitum*. A megvilágítás természetes fény mellett mesterséges kiegészítéssel történt napi 16 óra időtartamban. A spermadonor állatok kiválogatását a kezelhetőség, illetve az ondóvételre való reagálóképesség, majd az egyedi ondóbírálati adatok alapján végeztük. Az ondóvétel (3. ábra) Burrows és Quinn (1937) dorso-abdominális masszázstechnikájával történt heti 2 alkalommal, 2 hónapon keresztül két hetes trenírozási időszakot követően. Ondóvétel után a mintákat szobahőmérsékleten (20-24°C) tároltuk az ondóminősítés elvégzéséig.



2. ábra: Fogolyszínű magyar kakas



3. ábra: Ondóvétel spermadonor kakastól

3.1.2. Ondóminősítés

Az ondó minősítésére minden esetben két alkalommal - a mélyhűtés előtt (friss minta), ill. a felengedés után (mélyhűtött/felolvasztott minta) - került sor. A minősítés során elvégeztük az ondó makroszkópos és mikroszkópos vizsgálatát. A következő spermatológiai paramétereket vizsgáltuk:

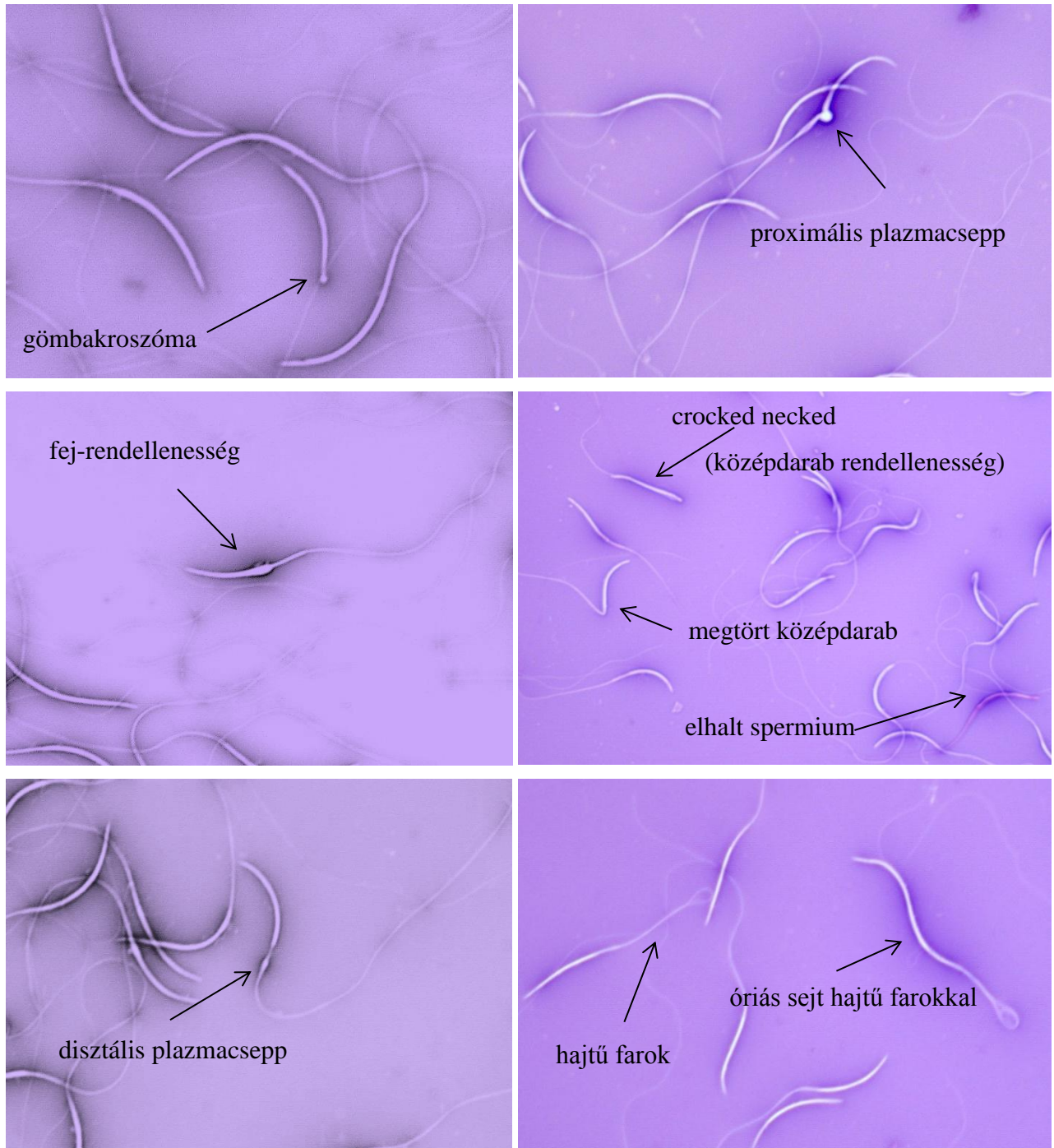
- Mennyiség (μl): meghatározása pipettával történt.
- Motilitás: a spermiumok tömegmozgásának meghatározása szubjektív becsléssel, 0-5-ig terjedő pontozásos skálán történt fénymikroszkóp (Leitz Diaplan, Leitz Wetzlar, Németország) segítségével 40x-es nagyítás mellett. A vizsgálatot mindig ugyanaz a gyakorlott személy végezte, így - szubjektivitása ellenére - alkalmas a tömegmozgás precíz, publikációkban is elfogadható megítélésére (*Wishart, 2000*). A kísérletek kezdete előtt összehasonlítást végeztünk a motilitás vizsgálatára egy magyar fejlesztésű CASA rendszerrel (*Caspar 2.0 software*) is és a szubjektív vizsgálat megegyezett a CASA-val mért adatokkal.
- Koncentráció ($10^6/\mu\text{l}$): megállapítását egy erre a célra kifejlesztett francia gyártmányú spektrofotométerrel (Accucell IMV, Franciaország) végeztük (*4. ábra*). Minden kísérlet indulása előtt a műszer adott fajra, illetve fajtára történő kalibrálására is szükség van (a műszer eredetileg lúd fajra van beállítva). Felállítunk egy koncentrációs görbét (*2. Melléklet*), melyhez az adott ondómintából egy hígítási sor készül. Ezeknek a hígított mintáknak a spektrofotométer által mért adatait összehasonlítjuk egy speciális, a spermiumok számlálására kifejlesztett Makler-kamrában történt manuális sejtszámolási adatokkal. Ily módon a későbbiekben a spektrofotométerben mért adatok a görbe segítségével megadják az adott minta aktuális sejt koncentrációját.
- Morfológiai rendellenességek típusai (*6-11. ábra*) és az élő/holt sejtarány: a vizsgálat eozin-anilin kék vitális festés segítségével történt (*5. ábra*).



4. ábra: Accucell spektrofotométer



5. ábra: Eozin-anilin kék vitális festés



6-11. ábra: Mélyhűtés során előforduló morfológiai rendellenességek típusai

3.1.3. Ondómélyhűtési protokollok

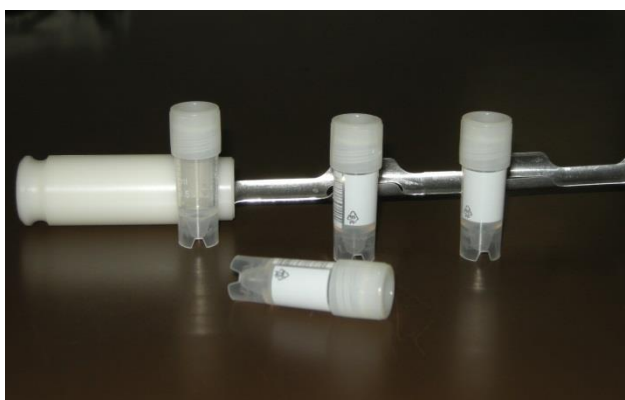
Vizsgálataink során kétféle mélyhűtési eljárást hasonlítottuk össze (1. táblázat): egy lassú, programozott mélyhűtést, illetve a gyors pellet-módszert. A vizsgálatokhoz használt vegyszereket a Reanal Laborvegyszer Kft-től, illetve a Sigma Aldrich Kft-től (Budapest, Magyarország) szereztük be.

1. táblázat: Ondómélyhűtési protokollok házityúk-fajban

| Mélyhűtési protokollok leírása | | |
|---------------------------------------|---|--|
| Fagyasztás üteme | Lassú | Gyors |
| Tárolás típusa | kriocső | pellet |
| Hígító | Lake-féle krioodat | Tselutin-féle hígító |
| Hígítási arány | 1:3 | 1:1 |
| Equilibrációs idő | 10 perc 5°C-on | 20 perc 2°C-on |
| Hűtési sebesség | 1°C/perc -35°C-ig 30°C/perc -60°C-ig | közvetlenül a folyékony nitrogénbe cseppentve (25 µl) |
| Krioprotektáns | 13,6% glicerol | 6% DMA |

Lassú mélyhűtési eljárás (Lake és Steward, 1978 alapján)

Ondóvétel után a kísérleti ólban 1 ml Lake-féle glicerolt tartalmazó krioodatot (Lake, 1968a) (3. Melléklet, 3. táblázat) adtunk a kevert ondómintákhoz, majd a laboratóriumban a kevert mintát szobahőmérsékleten (20-24°C) tovább hígítottuk úgy, hogy a végső hígítási arány 1:3 legyen. 5°C-os hűtőpultban történő 10 perces equilibráció után a mintákat 500 µl mennyiségben kriocsövekbe (12. ábra) mértük. A csöveket programozható mélyhűtőbe (Planer KRYO10, Planer Products Ltd, Middlesex, Egyesült Királyság) helyeztük (13. ábra).



12. ábra: Kriocsövek



13. ábra: Planer KRYO10 programozható mélyhűtő-berendezés

A mintákat 5°C-ról 1°C/perc hűtési ütemmel -35°C-ig, majd 30°C/perces ütemben -60°C-ig hűtöttük, végül folyékony nitrogénbe helyeztük a kriocsöveket. A felolvasztás 5°C-on történt, kb. 30 perc alatt, hűtőpultban. Ezt követően további, krioprotektáns nélküli felolvasztó hígítót (3. Melléklet, 4. táblázat) adtunk több lépésben a mintákhoz, majd a glicerol eltávolítása céljából a csöveket 5°C-ra hűtött centrifugába helyeztük és 15 percig 700g-n centrifugáltuk. A centrifugálást követően a felülúszót óvatosan leszívtuk, majd a cső alján maradt koncentrált ondómintát ismét az 5°C-os hűtőpultba helyeztük és mintánként 0,1 ml hígítót adtunk hozzá, majd óvatos rázással homogenizáltuk a mintát. A glicerol kivonása valamint az ondóminőség

ellenőrzése után a mintákat lezárt polisztirol dobozba helyeztük és ezt követően néhány percen belül került sor a mesterséges termékenyítésre.

Pellet-módszer (Tselutin, 1995 módszerének módosítása)

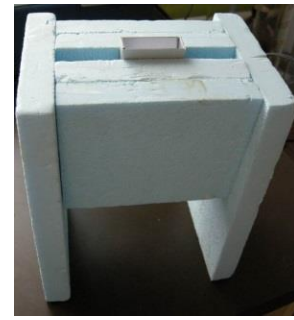
Ondóvételt követően a kísérleti ólban 1 ml Tselutin-féle (1995) hígítót (3. Melléklet, 5. táblázat) adtunk a kevert ondómintákhoz, majd a laboratóriumban a kevert mintát szobahőmérsékleten (20-24°C) tovább hígítottuk úgy, hogy a végső hígítási arány 1:1 legyen. 2°C-os hűtőpultban történő 20 perces equilibráció után a hígított mintához hozzáadtuk a DMA-t 6%-ban. Ezt követően repeater pipetta segítségével 25 µl térfogatban közvetlenül a folyékony nitrogénbe csöppentettük a kezelt ondómintákat (14. ábra). Az így keletkező golyócskákat (15. ábra) kriocsövekbe helyeztük, amelyeket folyékony nitrogénben tároltunk. A felolvasztás 70°C-on történt 10-20 másodperc alatt egy saját fejlesztésű automatikus melegítő készülékkel (16. ábra).



14. ábra: Ondóminta folyékony nitrogénbe cseppentése



15. ábra: 25 µl-es pellet



16. ábra: Felolvasztó készülék

3.1.4. Mesterséges termékenyítés

Három kísérleti csoportban, csoportonként 11 db 30 hetes TETRA SL tojóhibridet helyeztünk el mélyalmon. A mesterséges termékenyítéseket a spermadonor kakasoktól származó friss, hígított ondóval (kontroll csoport) és - 2-3 hónapig tárolt- mélyhűtött/felolvasztott (lassú mélyhűtés, ill. pellet-módszer) ondóval végeztük. A mesterséges termékenyítés egy speciális inszemináló pipettával (Microman, Gilson Medical Electronics, Franciaország) történt (17. ábra) az első héten három, majd hetente két alkalommal, 3 héten keresztül (összesen 8 alkalommal). A kontroll csoport tojóit alkalmanként 270 millió spermiummal, míg a mélyhűtött/felolvasztott csoportok tojóit 400-500 millió (mélyhűtött/felolvasztott) spermiummal inszemináltuk (18. ábra).

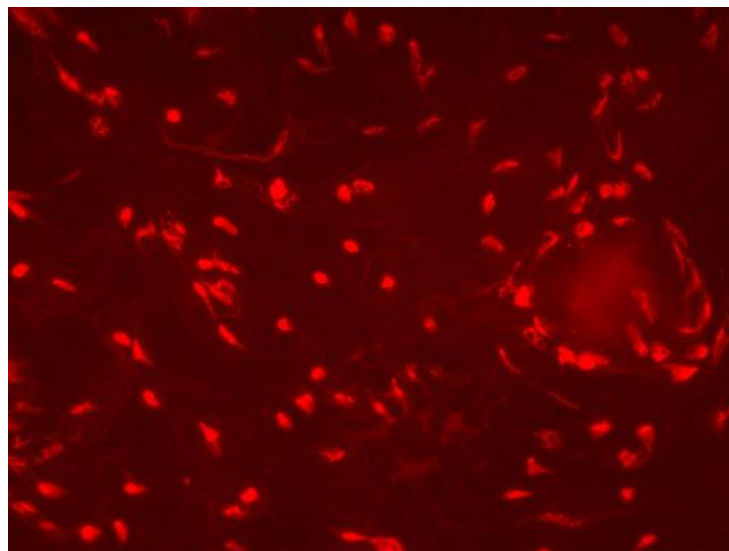


17. ábra: Inszemináló pipetta



18. ábra: Tetra SL tojó inszeminálása

A keltetőbe hetente berakott tojások (összesen 626 db) termékenységét lámpázással ellenőriztük az inkubáció 7. napján. A kilámpázott tojások vizsgálata során meghatároztuk a terméketlen, a nagyon korai, még a petevezetőben történő és az inkubációs (keltetés alatt történő) embrióelhalások, valamint a normális fejlődésű embriók arányát. A petevezetőben történt elhalásokat a csírákorong speciális festési eljárásával (19. ábra) állapítottuk meg a következők szerint: a feltört tojásokban szabad szemmel terméketlennek tűnő csírákorongokat kiemeltük, majd 0,9%-os NaCl oldatba helyeztük. Ezután a sejteket tárgylemezen propídium jodiddal festettük, amely egy nukleinsav-specifikus fluoreszcens festék, melynek segítségével az osztódott embrionális sejtek kimutathatók (Liptói *et al.*, 2004). A vizsgálathoz fluoreszcens mikroszkópot alkalmaztunk (Zeiss, Axioskop 2 plus, Carl Zeiss Light Microscopy, Göttingen, Németország).

19. ábra: Osztódó embrionális sejtek (PI-festés)
(Fotó: Dr. Liptói Krisztina)

3.2. Ondómélyhűtési kísérletek gyöngytyúkfabban (*Numida meleagris*)

Honosult baromfifajunk ondómélyhűtési kísérletei során különböző hűtési sebességű protokollokat (lassú- és gyors programozott mélyhűtés, nitrogéngőzös eljárás és pellet-módszer) teszteltünk a leghatékonyabb eljárás kidolgozása érdekében.

3.2.1. Kísérleti állatok és ondóvétel

Harminc egyéves magyar parlagi gyöngytyúk kakast helyeztünk el egyedi ketrecekben (20. ábra). Az állatok hagyományos kakastápot fogyasztottak, önitatókból ittak *ad libitum*. A megvilágítás, természetes fény mellett, mesterséges kiegészítéssel történt, napi 16 óra időtartamban. A spermadonor állatok kiválogatását - hasonlóan a házityúk-faj kakasaihoz - a kezelhetőség, illetve az ondóvételre való reagálóképesség, majd az egyedi ondóbírálati adatok alapján végeztük. Az ondóvétel szintén (21. ábra) *Burrows és Quinn (1937) dorso-abdominális* masszázstechnikájával történt heti 2 alkalommal, 3 hónapon keresztül két hetes trenírozási időszakot követően. Ondóvétel után a mintákat szobahőmérsékleten (20-24°C) tároltuk az ondóminősítés elvégzéséig.



20. ábra: Spermadonor gyöngytyúk kakasok egyedi ketrecekben



21. ábra: Ondóvétel gyöngytyúk kakastól

3.2.2. Ondóminősítés

Az ondó minősítésére a kísérlet folyamán minden esetben két alkalommal - a mélyhűtés előtt (friss minta), ill. a felolvasztás után (mélyhűtött/felolvasztott minta) - került sor. A spermológiai paraméterek vizsgálata a házityúk-fajnál leírtak szerint történt.

3.2.3. Ondómélyhűtési protokollok

A gyöngytyúk ondómélyhűtési kísérletei során négyféle - különböző hűtési sebességű - protokollt teszteltünk: lassú- és gyors programozott mélyhűtést, nitrogéngőzös eljárást, valamint a pellet-módszert (2. táblázat). Emellett három krioprotektáns (10% EG, 6% DMF, 6% DMA) hatékonyságát is vizsgáltuk.

2. táblázat: Ondómélyhűtési protokollok gyöngytyúkfajban

| Mélyhűtési protokollok | Lassú programozott | | Gyors programozott | | Nitrogéngőzös eljárás | | Pellet-módszer |
|------------------------|---|-------|--|-------|---|-------|------------------------------------|
| Tárolás típusa | kriocső | | | | | | pellet |
| Hígító | Lake-hígító | | | | | | Tselutin-hígító |
| Hígítási arány | 1:3 | | | | | | 1:1 |
| Equilibrációs idő | 25 perc 3°C-on | | 5 perc 5°C-on | | 5 perc 5°C-on | | 5 perc 2°C-on |
| Krioprotektáns | 10%EG | 6%DMF | 10%EG | 6%DMF | 10%EG | 6%DMF | 6%DMA |
| Hűtési sebesség | -1°C/perc -30°C-ig -30°C/perc -60°C-ig | | -15°C/perc -30°C-ig -30°C/perc -60°C-ig | | 4 cm-rel a folyékony nitrogén fölött (-120°C-on, 3 percig) | | közvetlenül a folyékony nitrogénbe |

Lassú, programozott mélyhűtés

Ondóvétel után a kevert mintát 1:3 arányban hígítottuk Lake-féle hígítóval (*Lake, 1968b*) (3. Melléklet, 6. táblázat) szobahőmérsékleten (20-24°C). A hígított mintákat két részre osztottuk, az egyikhez 10% EG-t, a másikhoz 6% DMF-et adtunk védőanyagként, majd az így előkészített mintákat 200 µl mennyiségben kriocsövekbe mértük. A csöveket programozható mélyhűtőbe (Planer KRYO10) helyeztük. A hűtést 20°C -ról indítottuk 3°C/perc hűtési ütemmel 3°C-ig, 25 perces 3°C-on történő egyensúlyozást követően 1°C/perces hűtési sebességgel -30°C-ig, majd 30°C/perces ütemben -60°C-ig hűtöttük, végül folyékony nitrogénbe helyeztük a kriocsöveket. A felolvasztás 5°C-os hűtőpultban történt 30 perc alatt.

Gyors, programozott mélyhűtés

Az ondóminta kezelése a lassú programozott mélyhűtéssel azonosan történt, azonban mindkét krioprotektáns esetében 5 percig egyensúlyoztuk a mintákat 5°C-on. Ezt követően a mintákat 200 µl mennyiségben kriocsövekbe mértük, majd a programozható mélyhűtő készülékbe helyeztük. A hűtést 5°C -ról indítottuk 15°C/perc hűtési ütemmel -30°C-ig, majd 30°C/perces hűtési sebességgel -60°C-ig hűtöttük, végül folyékony nitrogénbe helyeztük a kriocsöveket. A felolvasztás 5°C-on történt hűtőpultban 30 perc alatt.

Nitrogéngőzös eljárás

Az ondóminta előkezelése és egyensúlyozása a gyors programozott mélyhűtéssel azonosan történt, azonban az egyensúlyozás idő után a kriocsöveket a folyékony nitrogén felszínén úszó

kriocsőtartóba (22. ábra) helyeztük 3 percre, majd ezt követően folyékony nitrogénbe raktuk a kriocsöveket. A felolvasztás 38°C-os inkubátorban történt 3 perc alatt.



22. ábra: Nitrogéngőzös eljárás

Pellet-módszer

Ondóvételt követően a kevert mintát 1:1 arányban hígítottuk Tselutin-hígítóval (1995) szobahőmérsékleten (20-24°C), majd 2°C-os hűtőpultban történő 20 perces equilibráció után hozzáadtuk a DMA-t 6%-ban. Ezt követően pipetta segítségével 25 µl térfogatban közvetlenül a folyékony nitrogénbe csöppentettük a kezelt ondómintákat. Az így keletkező golyócskákat a már folyékony nitrogént tartalmazó kriocsövekbe helyeztük, amelyeket a továbbiakban folyékony nitrogénben tároltuk. A felolvasztást 70°C-on végeztük egy saját fejlesztésű automatikus melegítő készülékkel, hasonlóan a házityúk-fajnál alkalmazottakkal.

3.2.4. Mesterséges termékenyítés

A termékenyítési kísérlethez egyéves gyöngytyúk tojókat egyedi ketrecekben helyeztünk el a gyöngyös kakasokéval megegyező tartástechnológia mellett. A mélyhűtött/felolvasztott ondóminták minősítése alapján a két legeredményesebbnek bizonyult mélyhűtési protokoll hatékonyságát *in vivo* - mesterséges termékenyítéssel - is teszteltük a mélyhűtött ondóminták 1 hónapos tárolása után. Tíz gyöngytyúkot kontrollként friss, hígított ondóval, tízet 10% EG-t tartalmazó lassú eljárásból származó mélyhűtött/felolvasztott mintával, tízet pedig a pellet-módszerrel mélyhűtött/felolvasztott ondóval termékenyítettünk. A mesterséges termékenyítést hetente 3 alkalommal végeztük, 3 héten keresztül, alkalmanként 250-300 millió spermium bejuttatásával (23. ábra).



23. ábra: Gyöngytyúk-tojó mesterséges termékenyítése

A keltetőbe hetente berakott tojások (összesen 300) termékenységét lámpázással ellenőriztük az inkubáció 7. napján. A kilámpázott tojások vizsgálata a házityúk-fajnál korábban leírtak szerint történt.

3.3. Ondómélyhűtési kísérletek házilúd-fajban (*Anser anser*)

A gúnárondő mélyhűtése során egy - már ismert - programozott mélyhűtés (Łukaszewicz, 2002) módosított változatát és egy saját fejlesztésű nitrogéngőzös eljárást (Barna et al., 2010) hasonlítottuk össze *in vitro*. A kísérletet kiegészítettük különböző nem permeábilis ozmoprotektív anyagok (betain, trehalóz, szacharóz) tesztelésével, majd a legeredményesebb eljárás hatékonyságát *in vivo* - mesterséges termékenyítéssel - ellenőriztük.

3.3.1. Kísérleti állatok és ondóvétel

Harminc szürke landesi gúnarat (24. ábra) a tavaszi termelési ciklusuk kezdetén egyedi ketrecekben helyeztünk el 9,5 óra mesterséges megvilágítás mellett. A spermadonor állatok szabványos lúd tenyésztápot fogyasztottak (300g/gúnár/nap), az ivóvíz *ad libitum* állt rendelkezésükre. Az ondóvétel (25. ábra) Burrows és Quinn (1937) dorso-abdominális masszázstechnikájának lúdra módosított változatával speciális kettősfalú melegített ondóvevő edénybe történt heti 2 alkalommal 2 hónapon keresztül. A napi takarmányt az ondóvétel után kapták meg az állatok, hogy elkerüljük az ondó szennyeződését. Ondóvétel után a mintákat 5°C-on tároltuk az ondóminősítés elvégzéséig.



24. ábra: Szürke landesi lúd



25. ábra: Ondóvétele gúnártól

3.3.2. Ondóminősítés és ondókezelés

Az ondó minősítésére minden esetben két alkalommal - a mélyhűtés előtt (friss minta), ill. a felolvasztás után (mélyhűtött/felolvasztott minta) - került sor. A spermatológiai paraméterek vizsgálata a házityúk-fajnál leírtak szerint történt. Az ondóminősítés után a kevert ondómintákat 4°C-ra lehűtött csőbe töltöttük és a szintén 4°C-ra hűtött Łukaszewicz-féle (2002) hígítóval (3. Melléklet, 7. táblázat) 1:1 arányban hígítottuk, majd 5 percig equilibráltuk. Ezt követően a hígított mintához hozzáadtuk a krioprotektánsként alkalmazott DMF-et, illetve az ozmoprotektánsokat, majd 0,25 ml mennyiséget mértünk az előhűtött kriocsövekbe.

3.3.3. Ondómélyhűtési protokollok

Lassú, programozott mélyhűtés (Łukaszewicz, 2002 módszerének módosítása)

A módosítás abból állt, hogy az eredeti protokoll szerinti műszalmában történő mélyhűtést mi kriocsőben történő mélyhűtésre cseréltük, a 60°C/perc hűtési ütemet 40°C/percre mérsékeljük, korábbi kedvező tapasztalatainknak megfelelően (Barna *et al.*, 2010). A 4°C-ra előhűtött 0,25 ml ondót tartalmazó kriocsöveket a programozott mélyhűtő-berendezésünkbe (Planer, KRYO 10) helyeztük. A hűtést 4°C-ról indítottuk, majd - 40°C/perc hűtési ütemmel - 140°C-ig hűtöttük, ezt követően áthelyeztük a kriocsöveket a nitrogéntartályba. A felolvasztás 40°C-os vízfürdőben kb. 2 perc alatt történt.

Nitrogéngőzös eljárás

Az equilibrációs idő után egy polisztirol dobozba 4 cm magasságig folyékony nitrogént töltöttünk, majd a kriocsöveket a folyékony nitrogén felszínén úszó kriocsőtartóba raktuk 3

percre (-120°C), majd ezt követően folyékony nitrogénbe helyeztük a kriocsöveket. A felolvasztás szintén 40°C-os vízfürdőben történt. Mindkét mélyhűtési eljárásnál 4-4 különböző krio-, illetve ozmoprotektánst alkalmaztunk a 3. táblázat szerint.

3. táblázat: Ondómélyhűtési protokollok házilúd-fajban

| <i>Protokollok</i> | 1 | 2 | 3 | 4 |
|-------------------------------|----------|----------|-----------------------|------------------------------------|
| Programozott mélyhűtés | 7% DMF | 10% DMF | 10% DMF+0,1 M betain | 10% DMF +3% trehalóz +3% szacharóz |
| Nitrogéngőzös eljárás | 9% DMF | 12% DMF | 12% DMF+ 0,1 M betain | 12% DMF +3% trehalóz +3% szacharóz |

3.3.4. Mesterséges termékenyítés

Két 20-20 szürke landesi tojóból álló csoportot hoztunk létre a gúnarakéval megegyező tartástechnológia mellett. A mélyhűtött/felolvasztott ondóminták minősítése alapján a legeredményesebbnek bizonyult mélyhűtési protokoll hatékonyságát *in vivo* - mesterséges termékenyítéssel - is teszteltük a mélyhűtött ondóminták 7 hónapos tárolását követően. 20 tojót friss, hígított ondóval 20-at pedig a nitrogéngőzös eljárással az 1-es protokoll szerint mélyhűtött/felolvasztott mintával termékenyítettünk. A mesterséges termékenyítést (26. ábra) hetente 2 alkalommal végeztük, 3 héten keresztül, friss ondó esetében alkalmanként 40 millió, míg mélyhűtött/felolvasztott ondó esetében 100 millió spermium bejuttatásával.



26. ábra: Lúdtojó mesterséges termékenyítése
(Fotó: Dr. Liptói Krisztina)

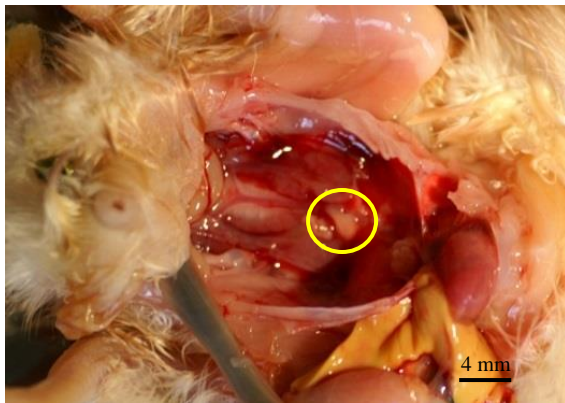
A keltetőbe hetente berakott tojások (összesen: 164 db) termékenységét lámpázással ellenőriztük az inkubáció 7. napján. A kilámpázott tojások vizsgálata a házityúk-fajnál korábban leírtak szerint történt.

3.4. A korai ivarszerv-szövetek mélyhűtési kísérletei

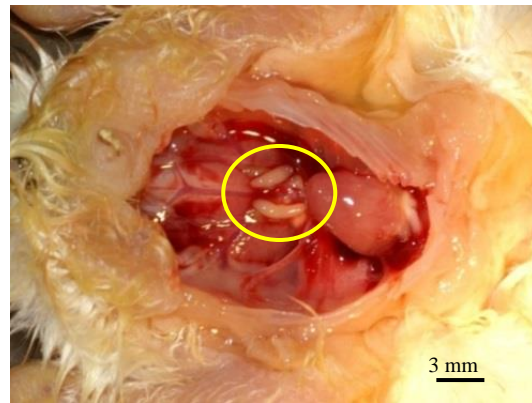
A korai ivarszervek tartósítására különböző mélyhűtési eljárásokat teszteltünk. A nitrogéngőzben, kriocsőben történő eljárás mellett vizsgáltuk a pellet-módszer és egy speciális vitrifikációs technika hatékonyságát. Olyan mélyhűtési eljárás kidolgozását céloztuk, mely a későbbiekben lehetővé teszi a mélyhűtött ivarszerv beültetését, így segítve a nőivar bevonását a génmegőrzési programokba.

3.4.1. Kísérleti állatok, donor ivarszervek eltávolítása

Ivarszervdonornak autosex Tetra SL naposcsibéket használtunk. A donor herék, illetve petefészkek eltávolítására (27-28. ábra) az állatok *cervicalis dislocatio*-ja után került sor. A műtési területet a tollpíhéktől mentesítettük, 70%-os alkohollal fertőtlenítettük, a szikzacskót eltávolítottuk. Ezt követően laminális boxban került sor az ivarszervek kivételére egy - a szemészeti műtétéknél használt- speciális csipesz és olló segítségével. Az eltávolított ivarszerveket mélyhűtésig (10-40 perc) steril DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) oldatot tartalmazó Petri-csészében tároltuk 0°C-on.



27. ábra: Naposkori petefészkek elhelyezkedése (Fotók: Dr. Liptói Krisztina)



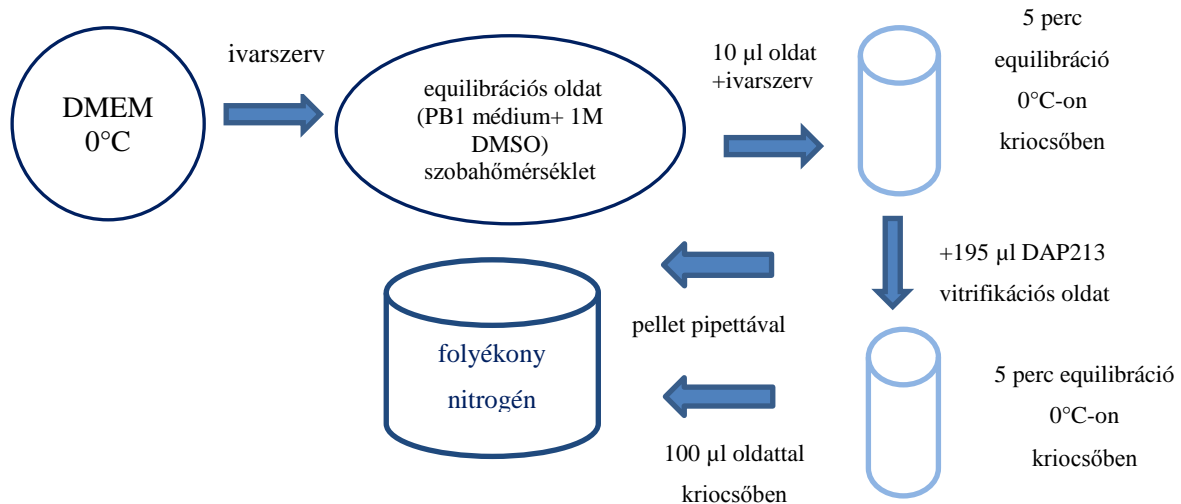
28. ábra: Naposkori herék elhelyezkedése

3.4.2. Korai ivarszervek mélyhűtése

A korai ivarszervek mélyhűtésére három különböző eljárást teszteltünk.

Nitrogéngőzös és pellet-módszer

A mélyhűtés során *Migishima et al., (2003)* egér petefészken alkalmazott módszerét adaptáltuk házityúk-fajra kisebb módosításokkal az alábbiak szerint (29. ábra).

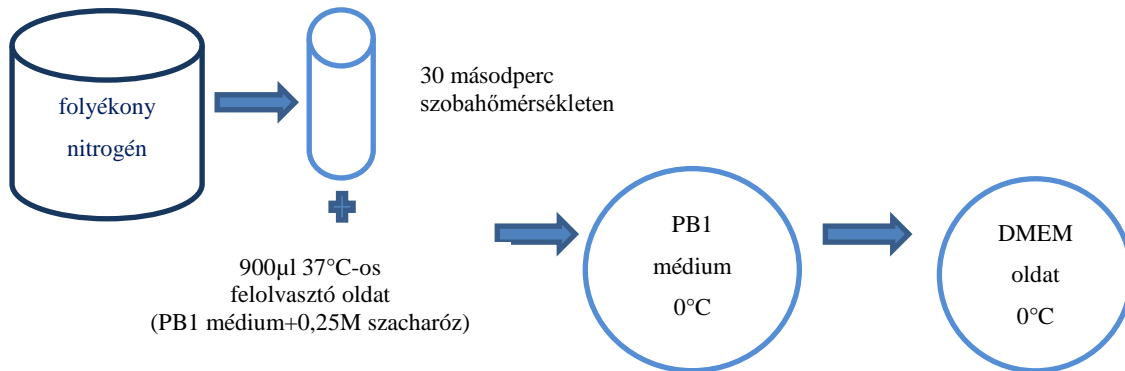


29. ábra: Korai ivarszervek nitrogéngőzös, illetve pellet-módszerrel történő mélyhűtése

A DMEM oldatban tárolt ivarszerveket szobahőmérsékleten (20-24°C) PB1 médium+1M DMSO-t tartalmazó equilibrációs oldatba helyeztük, majd az ivarszerveket 10 µl equilibrációs oldattal kriocsőbe raktuk és 5 percig equilibráltuk 0°C-on. Ezt követően a mintákat DAP 213 vitrifkációs oldat hozzáadása után ismét 5 percig equilibráltuk 0°C-on. A nitrogéngőzös eljárás esetében 100 µl oldat leszívása után a kriocsöveket közvetlenül a folyékony nitrogén felszínére dobtuk és mivel a kriocsövek levegőt is tartalmaztak, ezért nem süllyedtek le. Ezt követően még 5 percig tartottuk őket a folyékony nitrogént tartalmazó polisztirol dobozban, majd tároló tartályba helyeztük azokat. A pellet-módszernél az ivarszervet egy pipetta segítségével felszívtuk és közvetlenül a folyékony nitrogénbe cseppentettük a mintát, majd az így keletkezett pelleteket (70-100 µl) a folyékony nitrogén alatt kriocsövekbe raktuk. A kriocsöveket - a minták felolvasztásáig- folyékony nitrogént tartalmazó tárolótartályba helyeztük.

Az ivarszervek felolvasztásához (30. ábra) a mintákat tartalmazó kriocsöveket 30 másodpercig szobahőmérsékletre (20-24°C) helyeztük, majd a kriocsövekbe 900 µl PB1 médium+0,25M szacharóz-t tartalmazó 37°C-os felolvasztó oldatot mértünk. Ezt követően az

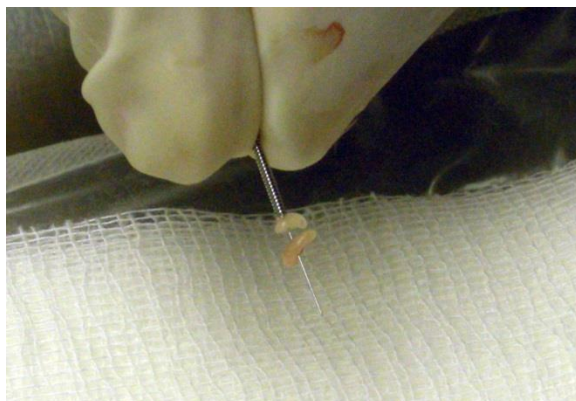
ivarszervet először 0°C-os PB1 médiumot, majd DMEM oldatot tartalmazó Petri-csészébe helyeztük.



30. ábra: Az ivarszervek felolvasztása

Vitrifikációs eljárás

A mélyhűtési eljárást Wang *et al.*, 2008 módszerének módosításával dolgoztuk ki. Az eltávolított ivarszerveket mélyhűtésig (10-40 perc) steril DPBS (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline) +20% FBS (Fetal Bovine Serum) oldatot tartalmazó Petri-csészében tároltuk 0°C-on. Az előkészített ivarszerveket akupunktúrás tűre húztuk fel (31. ábra). Egy tűre 2-3 ivarszervet raktunk. Az ivarszerveket szobahőmérsékleten (20-24°C) kétféle vitrifikációs oldattal kezeltük. Az ivarszerveket tartalmazó tűket 10 percre az 1. vitrifikációs oldatot (DPBS+20% FBS+7,5% DMSO+7,5% EG) tartalmazó, majd 2 percre a 2. vitrifikációs oldatot (DPBS+20%FBS+15% DMSO+15% EG+0,5M szacharóz) tartalmazó Petri-csészébe helyeztük (32. ábra). Az ivarszerveket tartalmazó tűket közvetlenül folyékony nitrogénbe mártottuk, majd azokat nitrogén alatt tartva kriocsövekbe helyeztük.



31. ábra: Az ivarszervek felszúrása az akupunktúrás tűre



32. ábra: Ivarszerveket tartalmazó tűk a vitrifikációs oldatban

Az ivarszervek felolvasztása szobahőmérsékleten (20-24°C) történt. A mélyhűtött ivarszervet tartalmazó tüket a kriocsőből kivettük és az 1. felolvasztó oldatot (DPBS+20%FBS+1M szacharóz) tartalmazó Petri-csészébe helyeztük 5 percre. Ezt követően a 2. (DPBS+20%FBS+0,5M szacharóz) majd a 3. (DPBS+20%FBS+0,25M szacharóz) felolvasztó oldatot tartalmazó Petri-csészébe helyeztük a mintákat 5-5 percre. Végül az ivarszerveket 0°C-os tároló oldatot (DPBS+20%FBS) tartalmazó Petri-csészébe raktuk.

A mélyhűtött ivarszervek épségét szövettani és szövettenyésztési vizsgálatokkal ellenőriztük.

3.4.3. Szövettani vizsgálatok

A mélyhűtött ivarszervek szerkezetének vizsgálatára mélyhűtési módszerként 5 herét és 5 petefészket felolvasztottunk és szövettani vizsgálatnak vetettük alá. Az ivarszerveket formalinban tároltuk a szövettani vizsgálatig. A szövettani vizsgálatokat a Szent István Egyetem Állatorvos-tudományi Karának Egzotikusállat és Vadegészségügyi Tanszékén végezték. A mintákat paraffinba ágyazták, majd hematoxylin-eozinnal festették meg. A szövettani felvételeket Spot 2.2.1. kamerával (Diagnostic Instrument Inc., Amerikai Egyesült Államok) és Zeiss mikroszkóppal (40x nagyítás) készítették. A szövetek szerkezeti épségének vizsgálata során összehasonlítottuk az egyes módszerek szerint mélyhűtött korai ivarszervek, illetve a friss (kontroll) naposkori ivarszervek szövettani képét.

3.4.4. Szövettenyésztési vizsgálatok

A mélyhűtött ivarszervek épségét szövettenyésztéssel is vizsgáltuk, ezért mélyhűtési módszerként szintén 5 herét és 5 petefészket felolvasztottunk és az ivarszervekből felszíni, kétdimenziós tenyészeteket indítottunk. A szövettenyésztési vizsgálatokhoz szükséges előkészületeket laminális boxban végeztük az alábbiak szerint: A felolvasztott ivarszervet egy kis Petri csészében 18-as tű végével 3-4 részre vágtuk. Csipesz segítségével 50 ml-es szövettenyésztő flaskába (Greiner Bio-One Hungary Kft.) tettük és üvegpipettával a flaska alján elhelyeztük. A flaska tetejét fedél nélkül hagyva pár percet vártunk, hogy a szervdarab az aljzathoz tapadjon. Egy 20 ml-es fecskendőben elkészítettük a tápoldatot: 15 ml DMEM oldat + 5 ml FBS (Fetal Bovine Serum Gold, PAA). Az így összekevert tápoldatot lassan a flaskába töltöttük, melyet 37,5°C-os inkubátorba helyeztük. A mintákat 5 napig inkubáltuk, a tápoldatot 2 naponta cseréltük. A szövettenyésztés eredményességének ellenőrzéshez inverz mikroszkópot (Zeiss, Carl Zeiss Light Microscopy, Göttingen, Németország), dokumentálásához

sztereomikroszkópot (Leica MZ6, Leica Microsystems, Wetzlar, Németország) illetve kamerát (Spot RT Color 2.2.1., Diagnostic Instruments, Inc., Michigan, Amerikai Egyesült Államok) használtunk 200x nagyítás mellett.

3.5. Statisztikai analízis

Az ondómélyhűtési kísérletek adatainak, valamint a termékenységi és az embrióelhalási adatok statisztikai elemzéséhez a Statistica 10.0 (StatSoft Magyarország Kft.) programot használtuk. A százalékban kifejezett adatok esetén *arcsin* transzformációt végeztünk, (*Harnos és Reiczigel, 2006*), majd több csoport eredményeinek összehasonlítása esetén ANOVA-t használtunk a szignifikanciaszint vizsgálatához, ezt követően pedig Fisher LSD tesztet végeztünk. Egyenletes eloszlás esetén egymintás t- próbát használtunk.

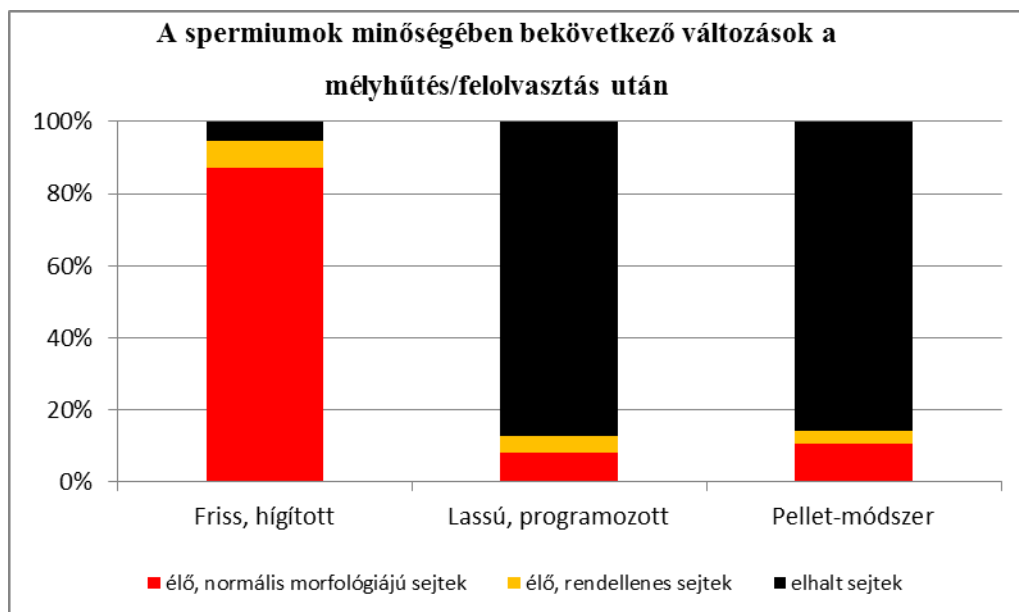
4. EREDMÉNYEK

4.1. Ondómélyhűtési kísérletek házityúk-fajban

Kísérletünk során a klasszikus lassú, programozott protokollhoz hasonlóan eredményes gyors, a gyakorlatban könnyebben, olcsóbban alkalmazható és egyszerűbben kivitelezhető módszert kívántunk kidolgozni. Ezért a lassú, programozott eljárás mellett a pellet-módszert teszteltük. A két eljárás hatékonyságát *in vitro* és *in vivo* vizsgálatokkal is ellenőriztük.

4.1.1. *In vitro* vizsgálatok

A mélyhűtést/felolvasztást követő spermium-minőséget vizsgálva láthatjuk (33. ábra), hogy a lassú mélyhűtési procedúrát követően az élő sejtarány (élő, normális morfológiájú+élő, rendellenes sejtek) 12,7%, míg a pellet módszer esetében 14,1% volt.



33. ábra: A mélyhűtés/felolvasztás utáni ondóminőség a kétféle protokoll esetében házityúk-fajban

Az *in vitro* összehasonlításokban mindig ellenőrizzük a mélyhűtés előtti kiindulási értékekhez viszonyított *sejt-túlélési arányt* (mélyhűtött-felolvasztott/friss, mélyhűtés előtti élő, normális morfológiájú sejtek aránya) is, mint a mélyhűtés hatékonyságának egyik legfontosabb mutatóját. Az élő, normális morfológiájú spermiumok túlélési aránya 9,3, ill. 12% volt a kétféle mélyhűtési protokoll esetében (4. táblázat).

4. táblázat: Az élő, normális morfológiájú spermiumok túlélési aránya

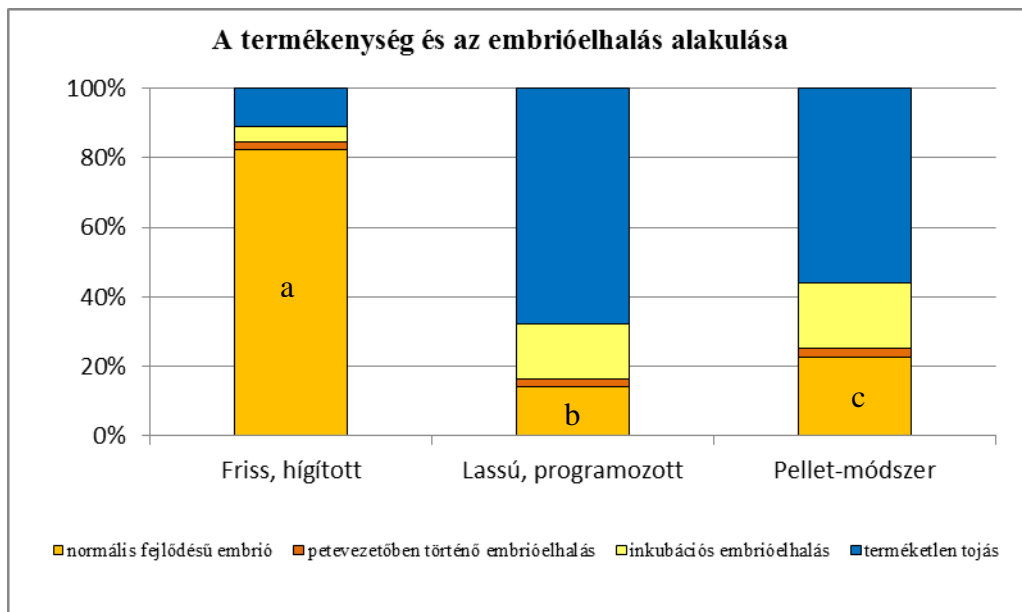
| Mélyhűtési protokollok | Túlélési arány (%) (élő, normális morfológiájú spermiumok) |
|-------------------------------|---|
| Lassú, programozott mélyhűtés | 9,3±3,91 |
| Pellet-módszer | 12±4,87 |

Az *in vitro* vizsgálatok eredményeinek alapjául szolgáló adatokat a 4. *Melléklet* tartalmazza.

4.1.2. *In vivo* vizsgálatok / Mesterséges termékenyítés

A fentiekhez hasonlóan a termékenyítőképesség vizsgálatokor sem találtunk szignifikáns különbséget a kétféle módon mélyhűtött kísérleti csoport között (34. *ábra*). A friss ondóval történő termékenyítés esetén mért 88,8%-os termékenységhez képest a lassú mélyhűtésből származó mintákkal történő termékenyítést követően 32,2%-os, míg a pellet módszer esetében 44,2%-os termékenységet (berakott tojások száma-terméketlen tojások száma) értünk el.

Korábbi vizsgálatainkhoz hasonlóan szoros korrelációt tapasztaltunk az inszeminált élő, normális morfológiájú spermiumok száma és a normális fejlődésű embriók aránya között. A kontrollként friss ondóval termékenyített csoportból származó tojások 82,3%-ban mutattak normális embriófejlődést a 7. napon történt lámpázáskor, míg a pellet módszerrel mélyhűtött/felolvasztott mintákkal történő termékenyítéseket követően ez az érték 22,6% volt, szignifikánsan ($p \leq 0,05$) magasabb a lassú mélyhűtési csoport tojásaiban talált normál fejlődésű embriók arányához képest (14,1%).



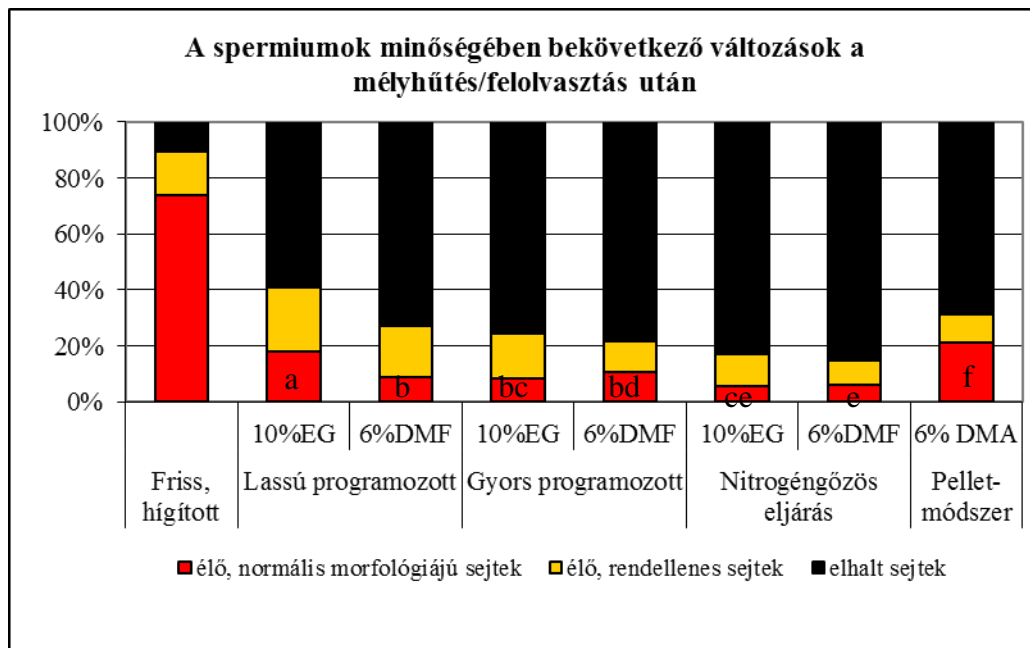
34. ábra: A termékenység, a normális fejlődésű embriók és az embrióelhalások alakulása a három kísérleti csoportban a mesterséges termékenyítések után házityúk-fajban. Az eltérő betűk (a,b,c) szignifikáns különbségeket jelölnek, ahol $p \leq 0,05$.

4.2. Ondómélyhűtési kísérletek gyöngytyúkfajban

A különböző mélyhűtési protokollok eredményességét a házityúk-fajhoz hasonlóan *in vitro* és *in vivo* vizsgálatok során ellenőriztük.

4.2.1. *In vitro* vizsgálatok

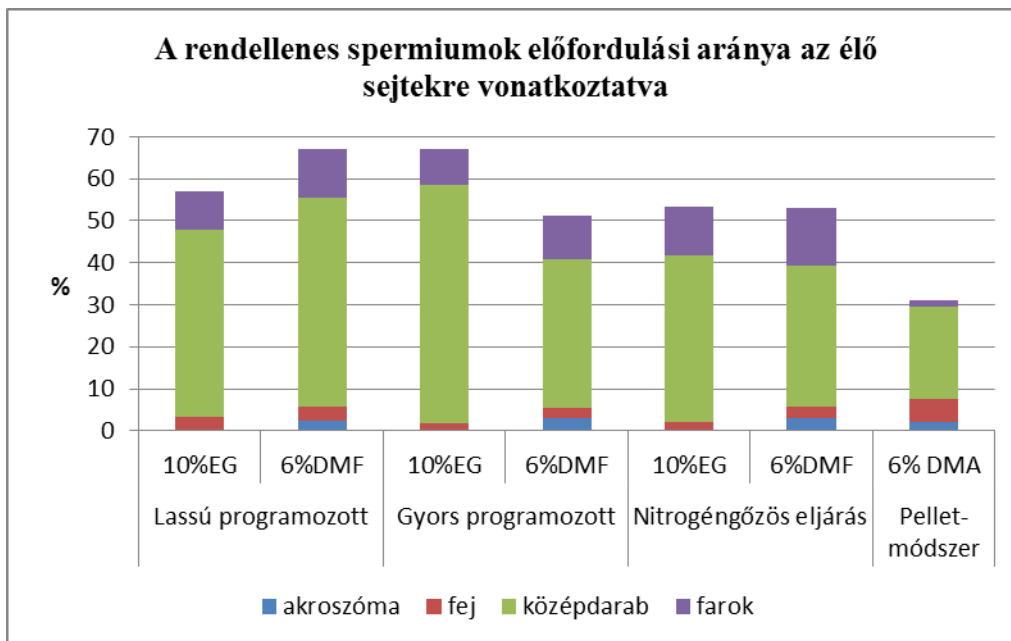
A mélyhűtést/felolvasztást követő spermium-minőséget vizsgálva láthatjuk (35. ábra), hogy a nitrogéngőzös eljárást követően volt legalacsonyabb az élő ondósejtek (élő, normális morfológiájú+élő, rendellenes sejtek) aránya (16,8%-EG ill. 14,8%-DMF) az összes mélyhűtési eljárás közül. A gyors programozott protokollok szignifikánsan ($p \leq 0,01$) magasabb élő sejtarányt eredményeztek (24,5%-EG ill. 21,7%-DMF) a nitrogéngőzös protokollokhoz képest. Az élő sejtek aránya a pellet-módszer (31,4%) és a 10% EG-t alkalmazó lassú programozott protokoll (41%) esetében volt a legmagasabb. Annak ellenére, hogy ez utóbbi módszer eredményezte a legtöbb összes élő sejtet, szignifikánsan ($p \leq 0,05$) több rendellenes spermiumot produkált (23 vs. 10%), mint a pellet-módszer. Így a legnagyobb élő, normális morfológiájú spermium arányt (21%) a pellet-módszernél találtuk.



35. ábra: A mélyhűtés/felolvasztás utáni ondóminőség az egyes protokollok esetében gyöngytyúkfajban

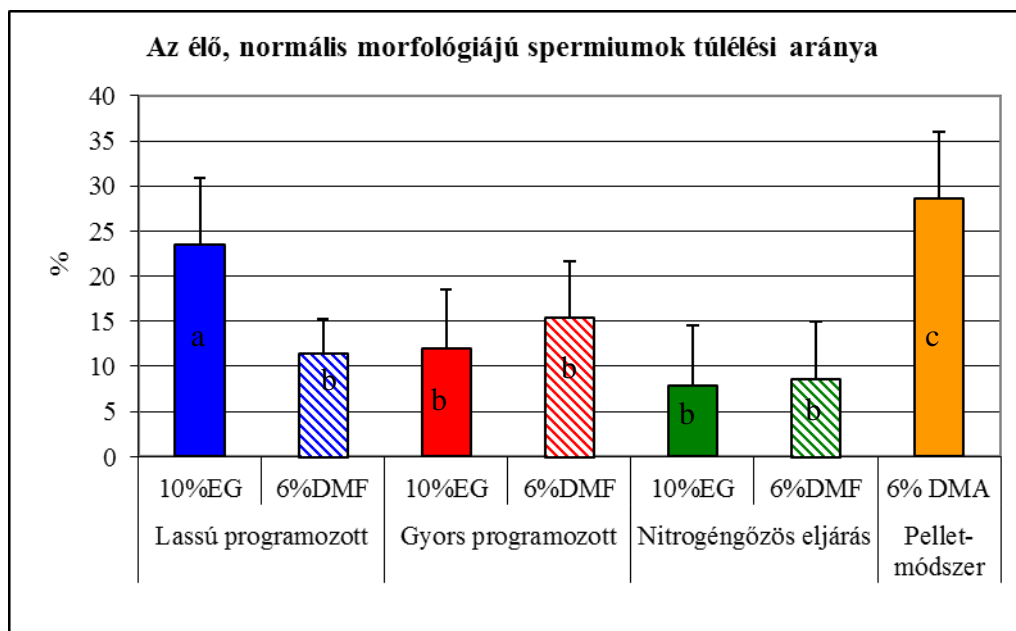
Az eltérő betűk (a,b,c,d,e,f) szignifikáns különbségeket jelölnek, ahol a-b, a-c, a-d, a-e, a-f, bd-ce, ce-f, e-f esetében $p \leq 0,01$; b-c, bc-bd esetében $p \leq 0,05$.

Mivel vizsgálataink során azt tapasztaltuk, hogy a lassú, programozott protokoll magasabb rendellenes sejtarányt produkált, ezért fontosnak tartottuk az abnormalitások típusainak eloszlását is analizálni. A rendellenesség típusok vizsgálata során azt tapasztaltuk, hogy a DMF minden hűtési sebesség esetében szignifikánsan magasabb ($p \leq 0,01$) akroszóma-rendellenességeket produkált. A pellet-módszer a feji rendellenességek tekintetében szignifikánsan a legmagasabb, míg a farok rendellenességek esetében a legalacsonyabb előfordulást eredményezte ($p \leq 0,01$), jóllehet, az összes protokollhoz képest a legkisebb arányban itt fordultak elő rendellenes sejtek. A legnagyobb arányban minden esetben a középdarab rendellenességei fordultak elő. (36. ábra).



36. ábra: A rendellenes spermiumok típusainak eloszlása az egyes protokollokban

A spermiumok a 10% EG-t tartalmazó lassú, programozott és a pellet-módszer esetében produkáltak a legmagasabb túlélést az élő normális morfológiájú sejtekre vonatkoztatva (23,5 és 28,6%). Utóbbival szignifikánsan jobb ($p \leq 0,05$) túlélési arányt értünk el. Se a gyors programozott módszerrel (12%-EG ill. 15,5%-DMF) se a nitrogéngőzős eljárással (7,9%-EG, 8,6%-DMF) nem találtunk elégséges sejt-túlélést (37. ábra).

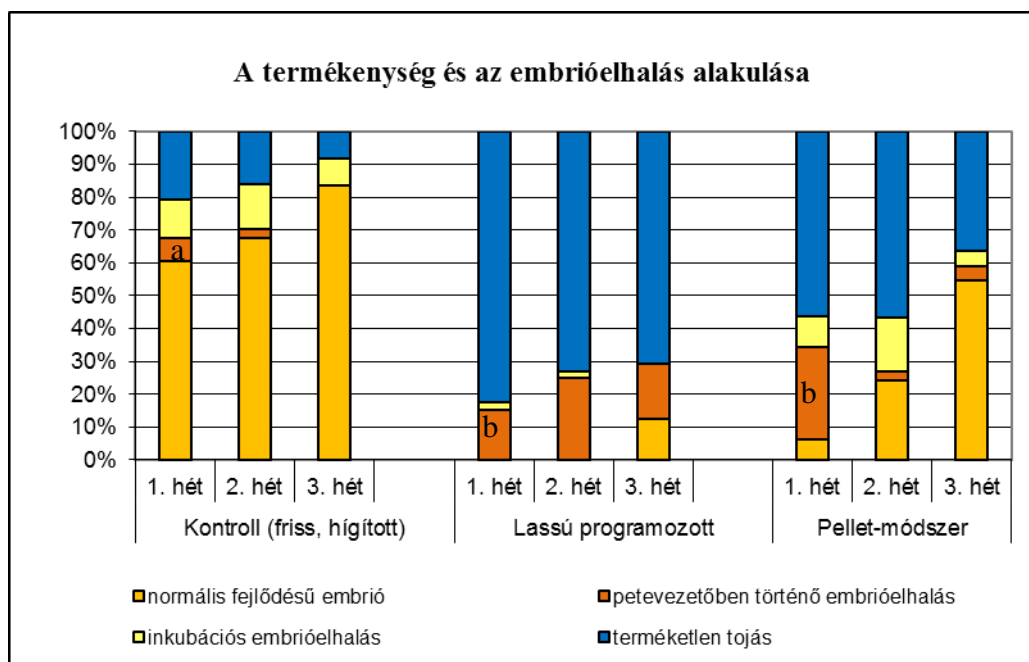


37. ábra: Az élő, normális morfológiájú spermiumok túlélési aránya az egyes protokollokban. Az eltérő betűk (a; b; c) jelzik a szignifikáns különbségeket ($a-b$ és $b-c$ $p \leq 0,01$, $a-c$ $p \leq 0,05$) az egyes mélyhűtési módszerek által produkált túlélési arányok között.

Az *in vitro* vizsgálatok eredményeinek alapjául szolgáló adatokat az 5. Melléklet tartalmazza.

4.2.2. *In vivo* vizsgálatok / Mesterséges termékenyítés

A két eredményesebb mélyhűtési protokollból származó mintákkal, valamint friss, hígított ondóval 3 gyöngytyúk-csoportban végeztük a termékenyítéseket. A háromhetes termékenyítési időszak végére a friss, hígított ondóval 91,7%-os, a lassú programozott protokollal mélyhűtött ondóval 29,1%-os, míg a pellet-módszerrel mélyhűtött spermiumokkal 63,6%-os termékenységet (berakott tojások száma-terméketlen tojások száma) értünk el. A tojások termékenysége - a lassú mélyhűtést kivéve- a termékenyítések számával növekvő, míg a korai, petevezetőben történő embrióelhalások tekintetében csökkenő tendenciát mutatott. A petevezetőben történő embrióelhalások a mélyhűtött ondóval történt termékenyítések után szignifikánsan ($p \leq 0,05$) magasabb arányban mutatkoztak a kontroll csoport tojásaihoz képest, melyek - a lassú, programozott csoport kivételével - a termékenyítések előrehaladtával csökkentek jelezve a spermiumtároló tubulusok fokozatos feltöltődését (38. ábra).



38. ábra: A termékenység, a normális fejlődésű embriók és az embrióelhalások alakulása a három kísérleti gyöngytyúk csoportban a mesterséges termékenyítések után. Az eltérő betűk (a,b) jelzik a szignifikáns különbségeket, ahol $p \leq 0,05$.

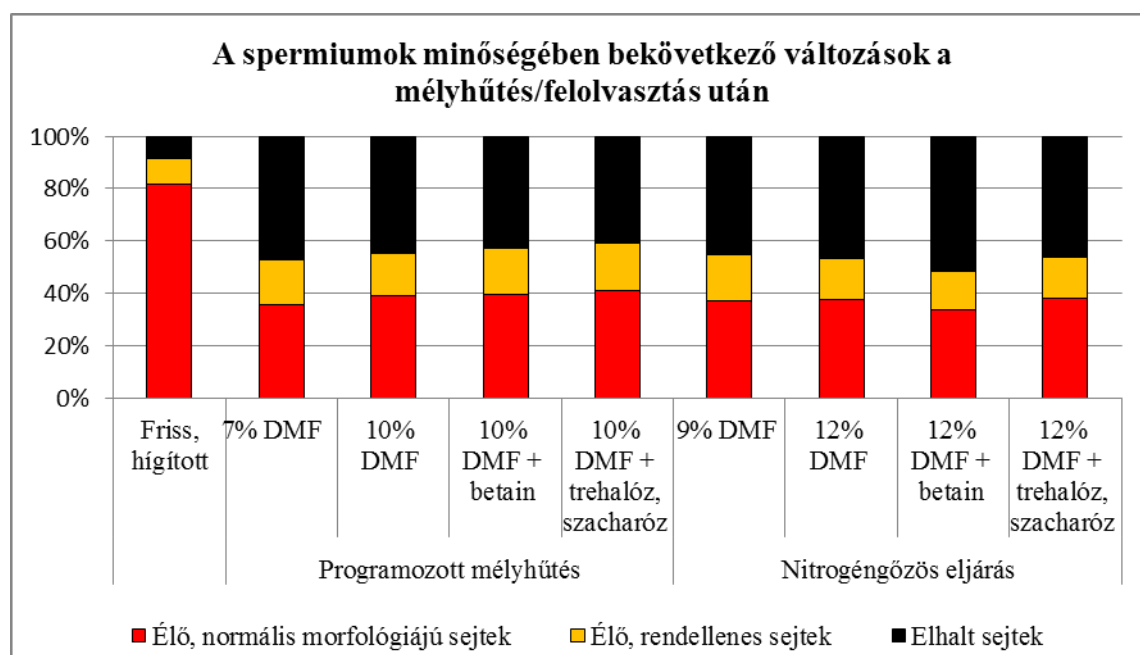
4.3. Ondómélyhűtési kísérletek házilúd-fajban

Első lépésként 4-4 különböző krio-, illetve ozmoprotektánst teszteltünk a lassú, programozott és a nitrogéngőzös eljárás esetében. Ezt követően a legeredményesebb eljárás hatékonyságát teszteltük *in vivo* mesterséges termékenyítéssel.

4.3.1. *In vitro* vizsgálatok

Az ondóminőséget vizsgálva a mélyhűtés/felolvasztás után láthatjuk (39. ábra), hogy a programozott módszert követően az élő ondósejtek (élő, normális morfológiájú+élő, rendellenes sejtek) aránya 52,5-59% között volt az egyes protokollokban, míg a nitrogéngőzös eljárás esetében 48,3-54,9% élő sejtarányt tapasztaltunk.

A *programozott* eljárásnál az 1 protokoll esetében, ahol a DMF koncentrációja a legalacsonyabb (7%) volt, szignifikánsan ($p \leq 0,01$) gyengébb volt az élő, normális morfológiájú spermiumok túlélése 2, 3 és 4 protokollokhoz képest (42,6; 47,9; 48,5; 50,3%) (5. táblázat). A *nitrogéngőzös* módszernél nem tapasztunk szignifikáns különbséget az egyes protokollok spermium-túlélése között (43-46%) és úgy tűnt, hogy 9% DMF koncentráció is elégséges a sejtek mélyhűtéssel szembeni védelméhez (6. táblázat). Előzetes várakozásainkkal ellentétben tehát sem a DMF koncentrációk, sem az ozmoprotektánsok (betain, trehalóz-szacharóz kombináció) nem javították szignifikánsan a mélyhűtött gúnár spermiumok túlélését a nitrogéngőzös protokollokban.



39. ábra: A gúnárondő minősége a mélyhűtés/felolvasztás után az egyes protokollok esetében

5. táblázat: Élő, normális morfológiájú spermiumok túlélési aránya gúnáronzóban programozott mélyhűtés esetén

| Mélyhűtési protokoll | | Túlélési arány (%) élő, normális morfológiájú spermiumok |
|-------------------------------|-----------------------------|---|
| Programozott mélyhűtés | 7% DMF | 42,6±6,92 a |
| | 10% DMF | 47,9±7,47 b |
| | 10% DMF+trehalóz, szacharóz | 48,5±5,91 b |
| | 10% DMF+betain | 50,3±7,41 b |

Az eltérő betűk (a,b) jelzik a szignifikáns különbségeket (a-b $p \leq 0,01$) az egyes mélyhűtési protokollok által produkált túlélési arányok között.

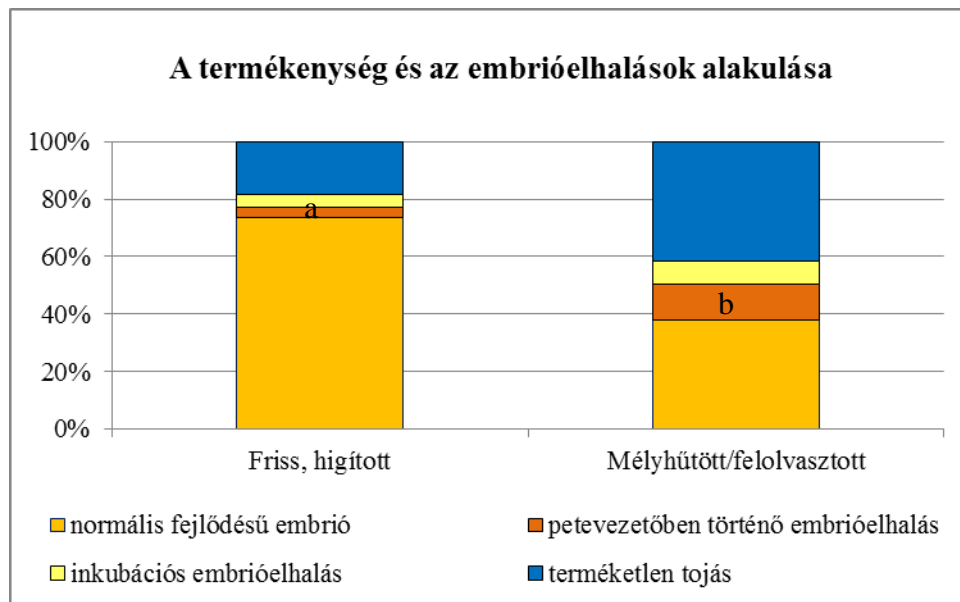
6. táblázat: Élő, normális morfológiájú spermiumok túlélési aránya gúnáronzóban nitrogéngőzős eljárás esetén

| Mélyhűtési protokoll | | Túlélési arány (%) élő, normális morfológiájú spermiumok |
|------------------------------|-----------------------------|---|
| Nitrogéngőzős eljárás | 9% DMF | 44,9±6,41 |
| | 12% DMF | 45,9±7,48 |
| | 12% DMF+trehalóz, szacharóz | 43,1±8,64 |
| | 12% DMF+betain | 46,2±6,04 |

Az *in vitro* vizsgálatok eredményeinek alapjául szolgáló adatokat a 6. *Melléklet* tartalmazza.

4.3.2. *In vivo* vizsgálatok / Mesterséges termékenyítés

Mivel az *in vitro* vizsgálatok alapján nem találtunk szignifikáns különbséget a programozott és a nitrogéngőzős eljárás sejttúlélése között, valamint az ozmoprotektánsok sem javítottak az eredményeken, ezért a gyakorlati tenyésztői munkában egyszerűbben kivitelezhető, 9% DMF-et tartalmazó nitrogéngőzős eljárás (1 protokoll) hatékonyságát teszteltük mesterséges termékenyítéssel. A termékenyítési kísérlet során a mélyhűtött ondóval 58,5%-os, míg a friss, hígított ondóval szignifikánsan ($p \leq 0,01$) magasabb 81,8%-os termékenységet (berakott tojások száma-terméketlen tojások száma) értünk el (40. ábra). A korai, petevezetőben történő embrióelhalások aránya a mélyhűtött ondóval történő termékenyítések (12,8%) esetében szignifikánsan ($p \leq 0,01$) magasabb volt a friss spermás termékenyítésekhez (3,4%) viszonyítva.



40. ábra: A termékenység, a normális fejlődésű embriók és az embrióelhalások alakulása a két kísérleti csoportban a mesterséges termékenyítések után házilúd-fajban
Az eltérő betűk (a,b) jelzik a szignifikáns különbségeket, ahol $p \leq 0,01$.

4.4. A korai ivarszerv-szövetek mélyhűtési kísérletei

A háromféle mélyhűtési módszerrel összesen 104 db petefészek és 175 db here mélyhűtési tartósítását végeztük el (7. táblázat).

7. táblázat: A mélyhűtött ivarszervek száma mélyhűtési módszerek szerint

| Mélyhűtési módszer | Mélyhűtött ivarszervek száma | |
|-----------------------|------------------------------|-----------|
| | Petefészek (db) | Here (db) |
| Nitrogéngőzös eljárás | 55 | 70 |
| Pellet-módszer | 11 | 16 |
| Vitrifikációs eljárás | 38 | 89 |

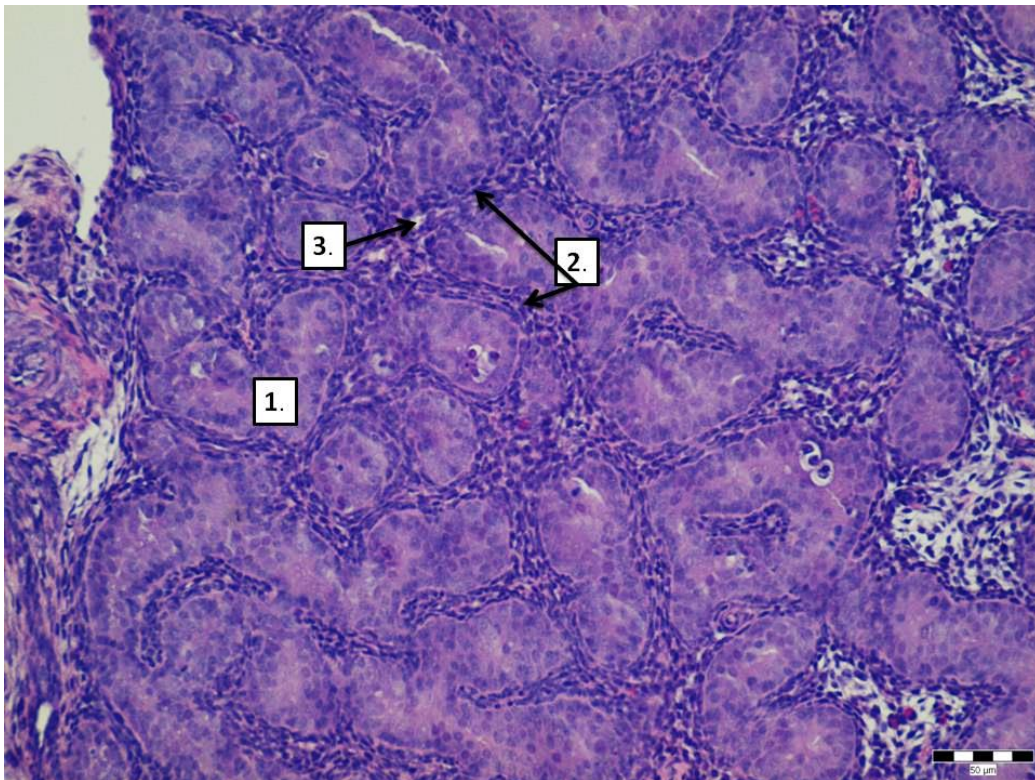
A nitrogéngőzös és a pellet-módszerrel, valamint a vitrifikációs eljárással mélyhűtött korai ivarszerv-szövetek szerkezetének épségét és életképességét szövettani és szövettényésztési vizsgálatokkal ellenőriztük.

4.4.1. Szövettani vizsgálatok

A szövetek struktúrájának, szerkezeti épségének vizsgálata során összehasonlítottuk az egyes módszerek szerint mélyhűtött korai ivarszervek, illetve a friss (kontroll) naposkori ivarszervek szövettani képét.

4.4.1.1. Friss naposkori here szövettani vizsgálata

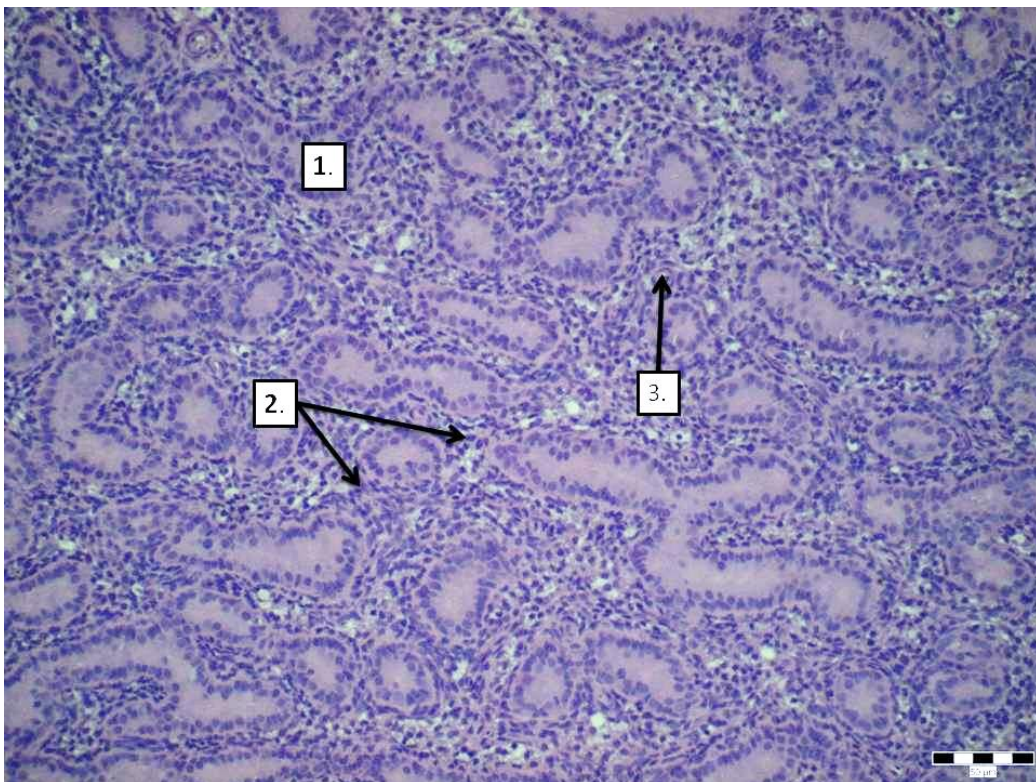
A friss - nem mélyhűtött - herék szövettani képén láthatjuk, hogy a herecsatornácskák alaphártyához kapcsolódó csírahámmal béleltek. A hámsejtek egy rétegben szorosan egymáshoz illeszkedve és az alaphártyához kapcsolódva ülnek. Magjuk gömb alakú, többnyire a sejtek középső részén helyeződnek, laza kromatinállománnyal rendelkeznek. A hámsejtek mag és citoplazma festődése homogén, egynemű. Az interstitium és a herecsatornácskák aránya az ép here szerkezetét mutatja (41. ábra).



41. ábra: Friss, kontroll here szövettani metszete (Fotó: Dr. Gál János)
1. herecsatornácska, 2. interstitium, 3. kapilláris.

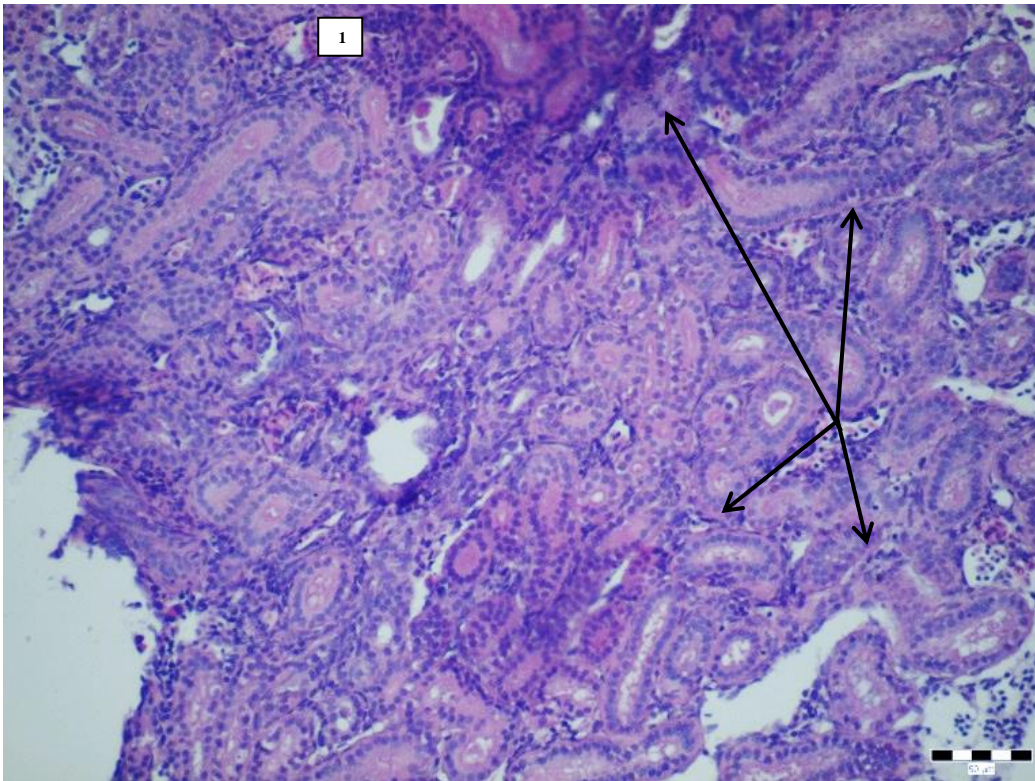
4.4.1.2. Mélyhűtött/felolvasztott herék szövettani vizsgálata

A nitrogéngőzös eljárással mélyhűtött here szövettani vizsgálata során is jól látható a herecsatornácskák alaphártyájához kapcsolódó csírahám. A hámsejtek a friss szövethez hasonlóan egy rétegben szorosan egymáshoz illeszkedve és az alaphártyához kapcsolódva ülnek. A sejtmagok itt eltérő méretűek, azonban nagyrészt gömb alakúak, többnyire a sejtek középső részén láthatóak. Helyenként olyan helyezkedésben ülnek a sejtek, mintha két réteget alkotnának. A hámsejtek mag és citoplazma festődése homogén, egynemű, hasonlóan a friss szövethez. Az interstitium és a herecsatornácskák aránya azonban a normális here szerkezettől eltérően alakul. A herecsatornácskák száma láthatóan kevesebb, kissé tágabb a lumenük és az interstitium nagyobb arányban van jelen (42. ábra).



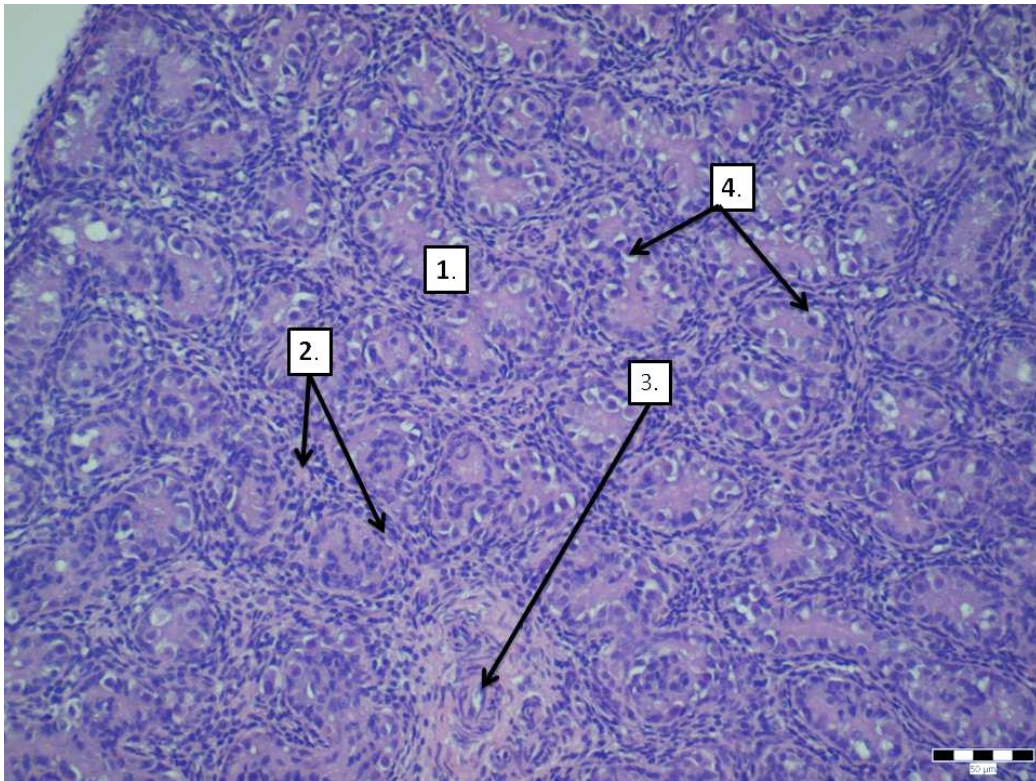
42. ábra: A nitrogéngőzös eljárással mélyhűtött here szövettani metszete (Fotó: Dr. Gál János)
1. herecsatornácska, 2. interstitium, 3. kapillaris.

A pellet módszerrel mélyhűtött here hasonló szövettani képet mutatott, mint a nitrogéngőzös eljárással mélyhűtött szerv szövettani képe. A szövettani metszeten látható, hogy a herecsatornácskák alaphártyához kapcsolódó csírahámmal béleltek. A herecsatornácskák felépítése megtartott. A csatornácskák között látható szakadozások az intersticiális részben a feldolgozás során létrejött artefaktumok (43. ábra).



43. ábra: A *pellet-módszerrel* mélyhűtött here szövettani metszete (Fotó: Dr. Gál János)
1. herecsatornácska, nyilak: szakadások az interstitiumban.

A *vitrifikációs eljárással* mélyhűtött herék esetében a herecsatornácskák szintén nagyrészt az alaphártyához kapcsolódó csírahámmal béleltek. A hámsejtek egy rétegben szorosan egymáshoz illeszkedve és az alaphártyához kapcsolódva ülnek, azonban tubulusonként 2-6 sejt ellökődése vagy lazább kapcsolódása figyelhető meg. Az ép sejtek magja gömb alakú, többnyire a sejtek középső részén ülnek, laza kromatinállománnyal rendelkeznek. A levált vagy laza kapcsolatban levő sejtek magja és festődése is heterogén, némelyik megkisebbedett. Az ép hámsejtek mag és citoplazma festődése homogén, egynemű. A herecsatornácskák kissé tágultak. Az interstitium és a herecsatornácskák aránya a friss here szerkezetére emlékeztet (44. ábra).

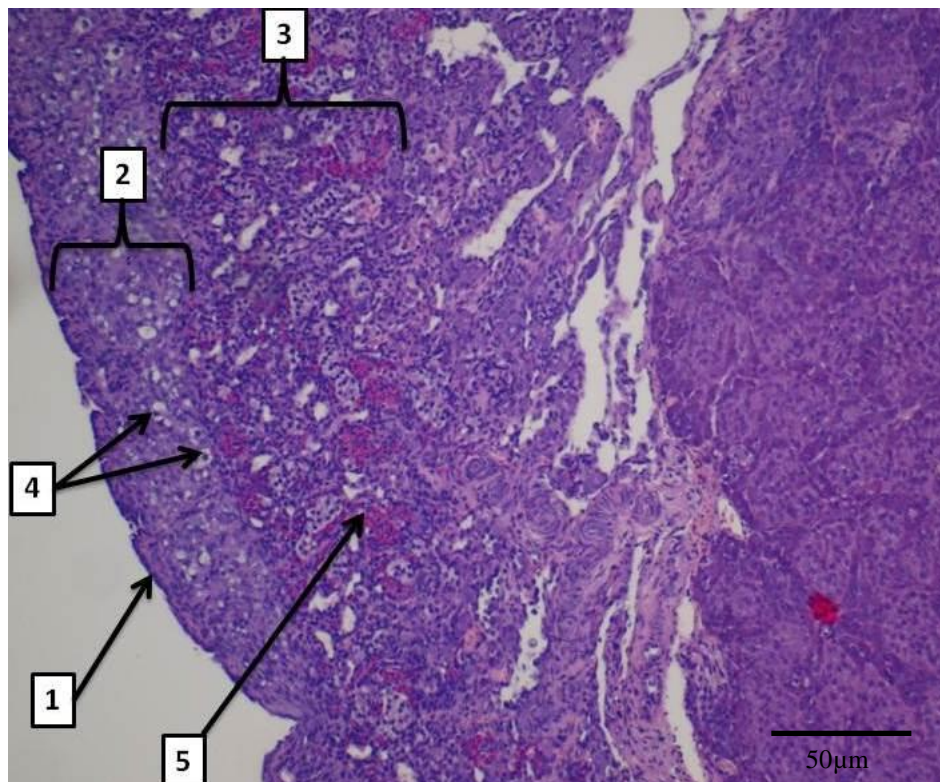


44. ábra: A vitrifikációs eljárással mélyhűtött here szövettani metszete (Fotó: Dr. Gál János)
 1. herecsatornácska, 2. interstitium, 3. kapilláris, 4. degenerálódott hámsejtek.

A három különböző eljárással mélyhűtött naposkori herék szövettani vizsgálata során látható, hogy a vitrifikációs eljárás őrizte meg leginkább a herék eredeti szerkezetét. A módszer alkalmazása után az interstitium és a herecsatornácskák aránya a friss here szerkezetét mutatta, tehát, feltételezhetően működőképes, míg a nitrogéngőzös és a pellet-módszer esetében ez nem mondható el.

4.4.1.3. Friss naposkori petefészekszövettani vizsgálata

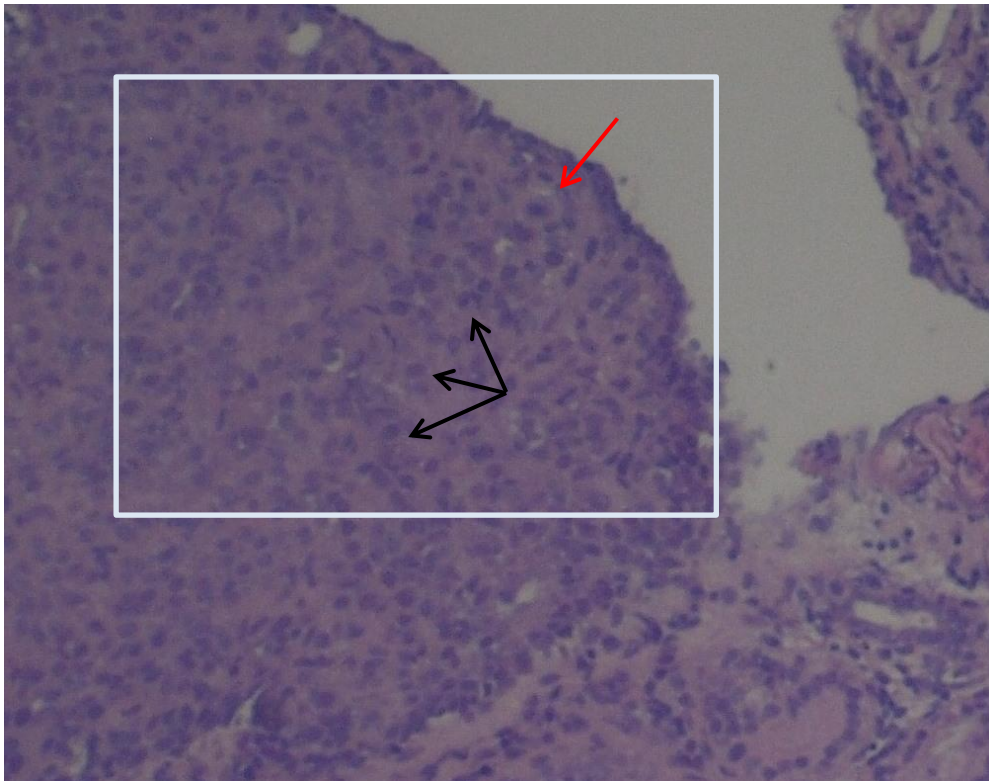
A naposkori petefészekszövettani képen látható, hogy kelés után már jól elkülöníthető a petefészek kéreg- és velőállománya. A kéregállományban található a csírahám, amelyben láthatóak az oogoniumok nagy kerek sejtjei és sejtmagjai. A velőállomány vérereket is tartalmaz, melyeknek nutritív funkciója van, valamint nagyrészt a kötőszöveti stroma alkotja (45. ábra).



45. ábra: Friss, kontroll petefészek szövettani metszete (Fotó: Dr. Gál János)
1. csirahám, 2. kéregállomány, 3. velőállomány, 4. ősvasejtek, 5. kapillárisok.

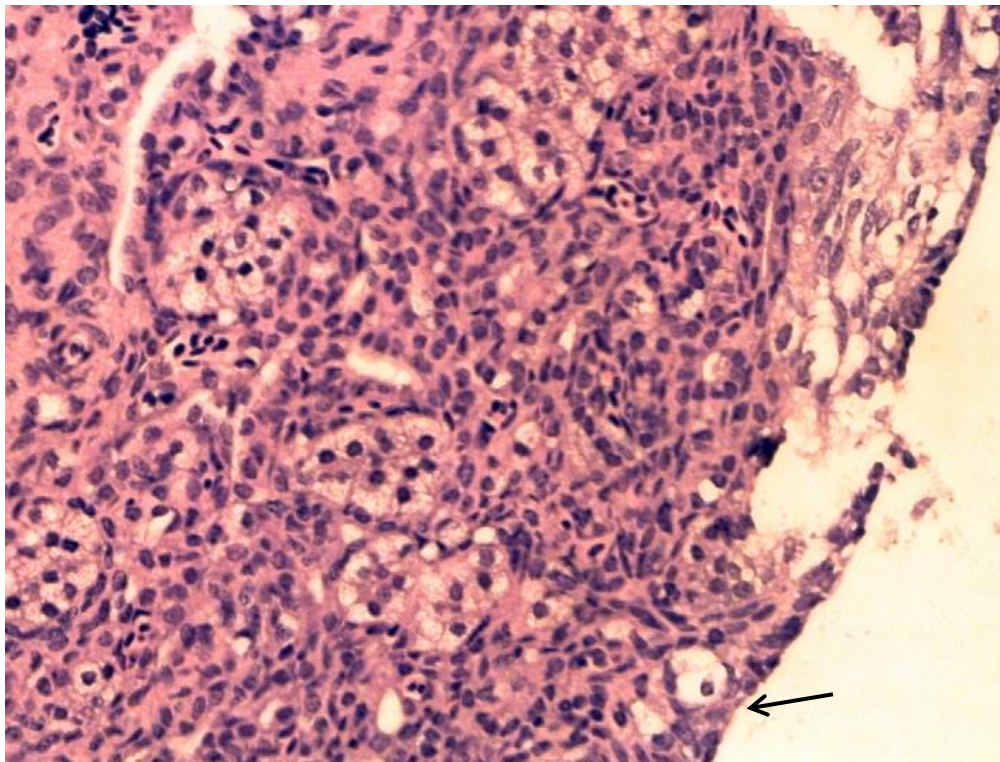
4.4.1.4. Mélyhűtött/felolvasztott petefészek szövettani vizsgálata

A *nitrogéngőzös eljárással* mélyhűtött petefészek szövettani képe alapján megállapítható, hogy a szövet szerkezeti felépítése megtartott. A mélyhűtött petefészek - a kontroll mintához hasonló - ép szerkezetet mutat. A szövettani képen a petefészek kéregállománya valamint veseszövetrészt is látható. A kéregállományban egy kialakuló primer tüsző látható granulosa sejtkezdeményekkel körülvéve, valamint oogoniumokat is megfigyelhetünk. A vesecsatornácskák kifejezetten tágultak, míg a petefészekszövetben szerkezeti elváltozást nem látunk (46. ábra).



46. ábra: A *nitrogéngőzös eljárással* mélyhűtött petefészek-részlet szövettani metszete
 fehér négyzet: petefészek kéregállománya, piros nyíl: kialakuló primer tüsző,
 fekete nyilak: oogoniumok (Fotó: Dr. Liptói Krisztina)

A *pellet-módszerrel* mélyhűtött petefészek szövettani vizsgálata során szintén ép szövetti szerkezetet figyeltünk meg. A kéregállományban egy oogonium is megfigyelhető. A szövetszélék szakadozottsága a preparátum készítése során keletkezett műtermék (47. ábra).



47. ábra: A *pellet-módszerrel* mélyhűtött petefészek-részlet szövettani metszete
 fekete nyíl: oogonium (Fotó: Dr. Liptói Krisztina)

A *vitrifikációs eljárással* mélyhűtött petefészek szövettani vizsgálata alapján nagy nagyításban látható a megtartott szöveti struktúra, valamint egy oogonium és a primer oocyta átalakulás határán lévő petesejt is megfigyelhető éppen kialakulóban levő granulosa sejtekkel félig körülvéve (48. ábra).



48. ábra: A vitrifikációs eljárással mélyhűtött petefészek-részlet szövettani metszete nagy nagyításban. Piros kör: oogonium és a primer oocyta átalakulás határán lévő petesejt

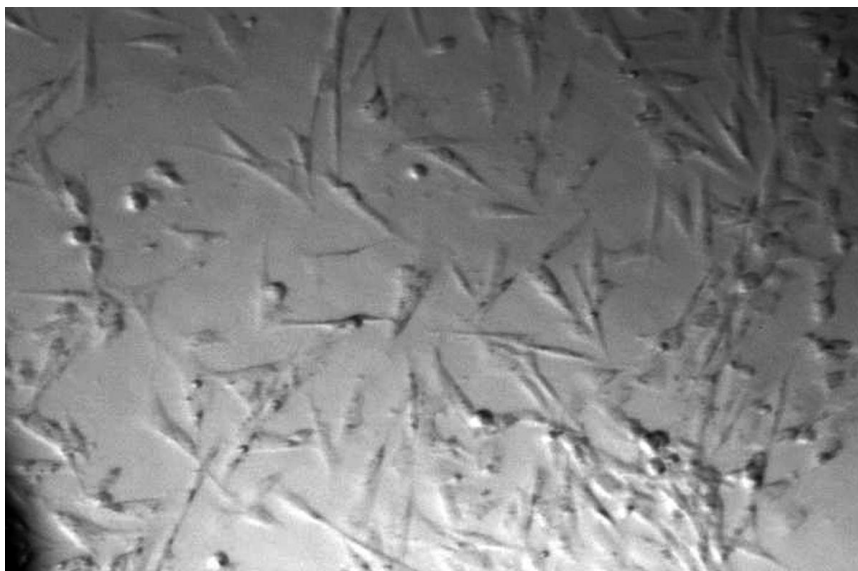
A három különböző eljárással mélyhűtött naposkori petefészkek szövettani vizsgálata során látható, hogy a petefészkek eredeti szerkezete megtartott, még ott is, ahol a veseszövet már láthatóan károsodott.

4.4.2. Szövettenyésztési vizsgálatok

A szövettenyésztés során - mindhárom protokoll szerint mélyhűtött/felolvasztott-szövetekből fibroblasztok nőttek ki (49-50. ábra). A fibroblasztok növekedésének beindulása a szokásos 1-2 nap helyett néhány napos késéssel következett be mindkét ivarszervtípus esetében.



49. ábra: Petefészekszövetből növekedésnek indult fibroblasztok
(Fotó: Dr. Liptói Krisztina)



50. ábra: Here szövetből növekedésnek indult fibroblasztok
(Fotó: Dr. Liptói Krisztina)

5. KÖVETKEZTETÉSEK ÉS JAVASLATOK

5.1. Ondómélyhűtési kísérletek

A madarak ondómélyhűtését, majd a felolvasztott ondóval való termékenyítést a szaporodásélettani sajátosságok, valamint az egyes fajok közötti anatómiai eltérések miatt számos tényező nehezíti. Az elmúlt 20-30 év kutatásai alapján nyilvánvalóvá vált, hogy *fajspecifikus mélyhűtési protokollokat* kell kidolgozni. Az *in vivo* spermiumtárolás jelensége miatt a spermiumoknak hosszabb ideig kell - a párzást vagy az inszeminálást követően - a termékenyítőképességüket megőrizni, továbbá a normális embriófejlődés érdekében több fitt hímivarsejtre van szükség. A fenti tényezők megnehezítik a hatékony *in vitro* génmegőrzési eljárások kidolgozását, de ezzel párhuzamosan folyamatos kihívást is jelentenek a spermabankok kialakítása során. Pillanatnyilag a baromfifajok közül csupán a házityúk-faj ondómélyhűtésével kapcsolatban található ajánlott mélyhűtési protokollt a génbankok kialakítását célzó FAO ajánlásban (FAO, 2012). A többi baromfifaj esetében - helytelenül - a házi tyúknál használt protokoll alkalmazását javasolja a leírás. Mivel a szakirodalomban található mélyhűtési kísérletek ellenére nincs egységes protokoll a különböző fajok ondómélyhűtésével kapcsolatban, ezért fontosnak tartottuk a különböző mélyhűtési eljárások hatékonyságának összehasonlítását. Kísérleteink eredményeképpen lehetővé válik, hogy különböző őshonos baromfifajaink esetében a leghatékonyabb mélyhűtési protokollokat alkalmazzuk az Intézetünkben folyamatban lévő spermabank kialakításánál.

A házityúk-fajon végzett ondómélyhűtési kísérleteink során a FAO által ajánlott klasszikus glicerolos eljárás hatékonyságát kívántuk elérni a pellet-módszerrel. *In vitro* vizsgálataink során nem találtunk szignifikáns eltérést az élő, normális morfológiájú spermiumok túlélésében a két eljárás között, valamint a kétféle módon mélyhűtött/felolvasztott mintákkal való termékenyítéseket követően a két csoport termékenysége között sem volt szignifikáns különbség. Ez a megfigyelés egybeesik spanyol kutatók megállapításával, akik a spanyol baromfi kriobank kialakítását elősegítő vizsgálataik során arra a következtetésre jutottak, hogy a hűtési sebességnek kevésbé volt hatása a termékenységre (Santiago-Moreno et al., 2011).

Mivel az általunk kidolgozott egyszerűsített és gyors pellet-módszer (25 µl-es pellet mérettel, repeater pipetta alkalmazásával és saját felolvasztó berendezéssel) a klasszikus lassú, programozott eljáráshoz hasonlóan hatékonyan bizonyult tyúkfaj esetében, ezért olyan ritka, veszélyeztetett tyúkfajták esetében javasoljuk a módszer alkalmazását, ahol kevesebb egyeddel, illetve kisebb ondómennyiséggel kell számolni, valamint olyan esetekben, amikor nem áll rendelkezésre programozható mélyhűtőberendezés.

Mivel a gyöngytyúkfaj ondómélyhűtésével - tudomásunk szerint- a világon csupán egy francia kutatócsoport és a mi laboratóriumunk foglalkozik, ezért pillanatnyilag a spermabanki tárolás céljainak megfelelő mélyhűtési protokoll még váratott magára. Ennek kidolgozása érdekében kétféle (lassú, ill. gyors) programozott, a nitrogéngőzös, valamint a pellet-módszer összehasonlításával kívántunk a faj sajátosságainak leginkább megfelelő protokollt kidolgozni. Vizsgálataink alapján megállapítottuk, hogy sem a gyors programozott, sem a nitrogéngőzös eljárás nem alkalmas a gyöngytyúk-spermiumok mélyhűtésére, mely egybeesik a francia kutatócsoport tapasztalatával, miszerint korábban a gyors programozott eljáráshoz hasonló protokoll alkalmazásával is csupán 20%-os termékenységet tudtak elérni (*Seigneurin és Blesbois, 2006*). Kísérletünkben a spermiumok a lassú, programozott és a pellet-módszer esetében eredményezték a legmagasabb túlélést az élő normális morfológiájú sejtekre vonatkoztatva. Utóbbival szignifikánsan jobb túlélési arányt értünk el, valamint ebben az esetben volt a legalacsonyabb a rendellenes sejtek aránya. A termékenyítési kísérletek során a pellet-módszerrel mélyhűtött spermiumokkal a világon elsőként 63,6%-os termékenységet sikerült elérnünk gyöngytyúkfajban (*Váradí et al., 2013*). Vizsgálatainkat követően a korábban már említett francia kutatócsoport a gyöngytyúk spermiumok génbanki tárolására is alkalmas továbbfejlesztett mélyhűtési módszert kívánt kidolgozni, melynek érdekében műszalmát használtak a kisebb helyigény és a könnyebb azonosíthatóság érdekében. Az általuk tesztelt protokollok közül a 30°C/perc hűtési sebességet, 0,5 ml-es műszalmát valamint 6% DMF-et alkalmazó eljárással, valamivel magasabb, 71%-os termékenységet tudtak elérni (*Seigneurin et al., 2013*).

A gúnárondő mélyhűtésére elsősorban programozott eljárásokat alkalmaz az ezzel foglalkozó néhány laboratórium (*Lukaszewicz, 2001, 2002; Lukaszewicz et al., 2004*), azonban egyéb mélyhűtési eljárások tesztelésével lehetővé válik a legoptimálisabb eljárás kidolgozása. Kísérleteinkben a programozott módszert hasonlítottuk össze az olcsóbb, egyszerűbben kivitelezhető nitrogéngőzös eljárással, emellett különböző krio- és ozmoprotektánsok hatását is vizsgáltuk. A dolgozatban bemutatott *in vitro* vizsgálataink alapján nem találtunk szignifikáns különbséget a programozott és a nitrogéngőzös eljárással mélyhűtött spermiumok túlélése között, jóllehet, korábbi vizsgálataink során a programozott protokoll használatával magasabb sejttúlélést (70% vs. 52%) értünk el a nitrogéngőzös módszerhez képest (*Barna et al., 2010*). Mivel vizsgálatainkban az ozmoprotektánsok nem javítottak a túlélési eredményeken, ezért az egyszerűbben és így gazdaságosabban kivitelezhető nitrogéngőzös eljárással mélyhűtött ondómintákkal végeztünk termékenyítési kísérleteket. Az általunk mélyhűtött gúnárondővel közel 60%-os termékenységet sikerült elérni, hasonlóan egy francia kutatócsoport eredményéhez, ők azonban egy lassú, programozott protokollt alkalmaztak (*Dubos et al., 2008*).

Vizsgálataink alapján megállapítható, hogy a nitrogéngőzös eljárás a programozott protokollokhoz hasonlóan alkalmas a lúdfaj ondómélyhűtésére. A génmegőrzési hasznosítás mellett az eljárás a hétköznapi tenyésztői munkába is beilleszthető. Alkalmazásával kiküszöbölhetők a faj szaporodásbiológiai sajátosságaiból eredő problémák (monogámia, az ivari ciklus kezdete és vége közötti eltolódások a két ivarban, illetve az ivari ciklus végén jellemzően bekövetkező termékenységsökkenés) és hatékonysága nem sokkal marad el a friss, hígított ondóval történő termékenyítések eredményességétől (70-80%). A mélyhűtés akár egy állattartó telepen is megvalósítható és nincs szükség drága programozható mélyhűtő berendezésre, ezért merjük ajánlani a mélyhűtött gúnárondővel történő mesterséges termékenyítés használatát a tenyésztésben.

Jelenleg még nincs teljesen egységes álláspont arra vonatkozóan, hogy az *in vitro* génbankokban elhelyezett mintáknál melyik tárolótípus a legmegfelelőbb (múszalma, kriocső, pellet), egyáltalán kell-e egységes tároláshoz ragaszkodni, jóllehet legtöbbször a hagyományos múszalmás tárolást részesítik előnyben (*Mortimer et al., 1976; Blesbois, 2011*). Ezzel szemben saját tapasztalataink szerint házi tyúk- és házilúd-faj lassú ondómélyhűtése esetében a kriocsöves tárolás magasabb túlélést eredményezett, mint a múszalmás (*Barna et al., 2008, 2010*). A múszalma mellett elsősorban a tároló konténerekben történő gazdaságosabb helykihasználás, valamint a minták beazonosíthatóságának biztonságosabb volta szól. Ma már azonban a minták beazonosítására - az erre illetékes cégek - tökéletes fejlesztéseket végeztek az kriocsövek esetében is, azok jelölhetősége azonos, sőt jobban olvasható a múszalmákhoz képest. A pellet formában történő tárolás ellen szól, hogy ezzel a módszerrel még nincs elegendő tapasztalat arra vonatkozóan, hogy hosszútávon képesek-e minőségromlás nélkül fennmaradni a minták. A fenti módszer mellett szól, elsősorban a ritka, egyedi tulajdonságokkal és kis egyedszámmal rendelkező állományoknál, hogy ennek a módszernek minimális a költségigénye, hiszen nincs szükség sokmillió automatizált mélyhűtőberendezésekre, a mélyhűtés akár a farmon is megvalósítható, a minták már fagyott állapotban szállíthatók a génbankba.

Az irodalmi feldolgozásban bemutatott mélyhűtési eredmények, valamint a laboratóriumunkban végzett kutatási eredmények feltűnően nagy különbségeket mutatnak a termékenységi adatokban. Ennek oka elsősorban az, hogy a különböző laboratóriumok nem egységes technikákat alkalmaznak, azaz a termékenyítések módszerei között nagy különbségek adódnak. Az egyes eljárások esetén a termékenységi eredmények nagyban függenek az inszeminálás gyakoriságától és az inszeminált spermium mennyiségétől is, valamint a nőivarú állatok termelési ciklusban lévő státuszától (*Bakst et al., 1994; Barna et al., 2009*). Tekintettel az *in vivo* spermiumtárolás jelenségére madarak esetében, a feltüntetett fertilitási eredmények csak a fent említettek ismeretében nyújtanak értékelhető és összehasonlítható adatokat. Sok esetben

nincs tudomásunk arról, hogy milyen mennyiségben inszemináltak a hígított ondóval, milyen spermium-koncentrációkat alkalmaztak, és milyen gyakorisággal. A mi laboratóriumunk a mélyhűtött ondóval legkevesebb három héten át termékenyít és ennek az eredményeit veszi figyelembe, más laboratóriumokban számos esetben előfordul azonban - számunkra érthetetlen módon - hogy csupán egyetlen, vagy 2-3 inszeminálás eredményéből vonnak le következtetéseket. Több szerző véleményével egyetértünk abban, hogy a termékenység nagyobb részt a termékenyítési technikától, mintsem a sikeresebb ondómélyhűtéstől függ (*Lukaszewicz, 2002; Dubos et al., 2008*). Mivel a mélyhűtött ondó termékenyítőképessége az eljárás során jelentősen csökken, ezért egyértelmű, hogy mesterséges termékenyítéskor jóval magasabb termékenyítési dózist kell alkalmazni, amit sokszor nem jeleznek a szerzők, emellett növelni kell az inszeminálások gyakoriságát (*Hammerstedt és Graham, 1992*). Ezt támasztja alá *Lukaszewicz (2002)* vizsgálata is, mely során gúnárondőval való heti kétszeri termékenyítéssel 10%-kal növelte a termékenységet a heti egyszeri inszeminálással szemben. Ezzel szemben tyúkfaj esetében a termékenyítési dózis megduplázása (360 millió) sem volt elegendő ahhoz, hogy szignifikánsan emelje a termékenységet (*Bielefeldt, 1985*). Ha figyelembe vesszük *Wishart (1985)* megállapítását, miszerint a mélyhűtött felolvasztott baromfiondő termékenyítőképessége csupán 1,6% a friss spermához képest, akkor elméletileg ahhoz, hogy mélyhűtött spermával is elérjük ugyanazt a termékenységet, majdnem 100-szoros mennyiségű spermiummal kellene termékenyíteni. Ehhez azonban centrifugálással kellene a spermiumokat besűríteni, ami tovább gyengítené azok minőségét. Egy korábbi FAO ajánlás (*1998*) szerint házityúk-faj esetében a sikeres termékenység eléréséhez 600 millió spermiumot kell bejuttatni, azonban az inszeminálási dózis mennyiségi korlátját is tekintetbe kell venni, ezért ezt a koncentrációt 60-100 µl mennyiségben célszerű inszeminálni. Egyes vélemények szerint a maximális termékenyítési mennyiség 200 µl, ennél nagyobb adag bejuttatása az ondó elfolyása miatt spermiumvesztéshez vezet (*Ehling et al., 2012*), melyet saját kísérleteink során is tapasztaltunk. Saját korábbi tapasztalataink (*Végi et al., 2005*) és a szakirodalmi adatok alapján megállapítható, hogy házityúk-faj esetében a magasabb termékenység eléréséhez a mélyhűtött/felolvasztott ondó esetében minimum 500-600 millió spermiummal célszerű termékenyíteni, ahol legalább 200 millió intakt spermium áll rendelkezésre maximálisan 200 µl mennyiségben, és a termékenyítéseket heti 3 alkalommal végezni. Ezzel feltételezhetően viszonylag rövid időn belül magas termékenységet és megfelelő mennyiségű utódot tudunk előállítani akár génmegőrzési célokból is.

Az elmúlt évek ondómélyhűtésekkel kapcsolatos vizsgálatai alapján megfigyeltük, hogy a nagyon korai, még a petevezetőben történő embrióelhalások a mélyhűtött ondóval történt első néhány termékenyítés után szignifikánsan magasabb arányban mutatkoztak egyrészt a friss

spermás termékenyítésekhez képest, másrészt az egyéb korai embrióelhalásokhoz képest. Ennek háttérében valószínűleg az áll, hogy a gyengébb minőségű mélyhűtött/felolvasztott spermiumok közül nem rakódik be elegendő a spermiumtároló tubulusokba ahhoz, hogy a termékenyítés helyszínén meglegyen az az optimális spermiumszám, ami a normális embriófejlődéshez szükséges, ennek köszönhetően az embriók nagy része már igen korán, a petevezetőben elhal. Ezt igazoltuk egy idei kísérletünkben is, ahol három eltérő spermiumdózissal (1, 300 és 1000 millió spermium/tojó) termékenyítettünk tyúkokat. Az alacsony spermiumszámmal termékenyített tojóktól származó tojásokban szignifikánsan megnőtt a nagyon korai, petevezetőben történő embrióelhalások aránya (*Babarczi, 2015*).

5.2. Korai ivarszerv-szövetek mélyhűtési kísérletei

A petesejtekben tárolt női genetikai anyag megőrzésére a korai petefészekben található oogoniumok, illetve primer oocyták tartósítása nyújthat megoldást, mely a naposkori petefészekszövetek mélyhűtésével valósítható meg. Emellett bizonyos esetekben szükség lehet a hereszövetek mélyhűtéses tartósítására is (ha az ondóvétel és mélyhűtés nem megoldható valamilyen okból). Jóllehet az ilyen módszerrel nyert spermiumokkal történő termékenyítés csak intramagnalisan lehetséges, ami bonyolítja az utódnyerést, de adott esetben ez is megoldást jelenthet egyes fajták megmentésére.

Háromféle mélyhűtési módszert teszteltünk naposkori petefészek- és here szövetek esetében. A különböző eljárásokkal mélyhűtött naposkori herék szövettani vizsgálata során azt tapasztaltuk, hogy a vitrifikációs eljárás őrizte meg leginkább a herék eredeti szerkezetét. A módszer alkalmazása után az interstitium és a herecsatornácskák aránya a rendes here szerkezetét mutatta, míg a nitrogéngőzös és a pellet-módszer esetében ez nem mondható el minden esetben.

Vizsgálataink alapján megállapítható, hogy a hereszövet vitrifikációs eljárással történő mélyhűtése - mint alternatív génmegőrzési módszer - lehetővé teszi a veszélyeztetett fajok esetében az értékes hímek genetikai állományának megőrzését. Ezért javasoljuk a módszer alkalmazását olyan nagy genetikai értékű hímek esetében, ahol az ondó mélyhűtése valamilyen okból nem kivitelezhető.

A naposkori petefészek eltávolítása során nehézséget okozott, hogy a petefészek a mesonephros *ventromediális* felszínén fekszik, amely szinte lehetetlenné teszi a petefészek veseszövetektől mentes eltávolítását a donor naposcsibékből. Azonban a veseszövetek állapotában bekövetkező változások a mélyhűtés/felolvasztás után akár indikátorai is lehetnek a mélyhűtés szöveti károsító hatásának. A szövettani vizsgálatok során gyakran tapasztaltuk, hogy

a petefészekszövet akkor is megőrizte ép struktúráját, amikor a mellette lévő veseszövet már károsodást mutatott, jelezve azt, hogy a korai ivarszervek toleranciája a mélyhűtéssel szemben feltehetően magasabb, illetve, hogy az egyes szövetek eltérően tolerálják a mélyhűtéssel járó procedúrát.

A naposkori petefészekszövetek esetében mindhárom mélyhűtési eljárás megőrizte a szervek normális szerkezetét. A *vitifikációs eljárással* mélyhűtött petefészek szövettani vizsgálata során az oogonium és a primer oocyta átalakulás határán lévő petesejteket figyeltünk meg, mely egybeesik *González-Morán (2011)* tapasztalataival, aki naposkori petefészek szövettani vizsgálata során az oogoniumok és az oocyták jelenlétét is detektálta.

A mélyhűtött ivarszervek épségét szövettenyésztségi vizsgálatainkkal is alátámasztottuk, mely igazolta, hogy a naposkori ivarszervek túléltek a mélyhűtés/felolvasztás procedúráját. A fibroblasztok pár napos késéssel indultak növekedésnek, melynek háttérében feltételezhetően az ivarszervek külső szövetrétegének mélyhűtési procedura alatti károsodása állhat. A szervdarabok szélének sérülése miatt a fibroblasztoknak ezt a réteget át kell törniük, ez okozhatja a fent említett időbeni csúszást.

A vizsgálataink igazolták, hogy a korai ivarszervek vitifikációs eljárással történő mélyhűtéses tartósítása során megőrizhető az ivarszerv-szövetek épsége és eredeti struktúrája, mely lehetővé teszi a módszer génmegőrzési célokra való alkalmazását. Eredményeink alátámasztják *Liu és kutatócsoportja* véleményét, akik összehasonlító vizsgálatokat végeztek japán fürj (*Coturnix japonica*) petefészek mélyhűtésénél. A lassú, programozott és a vitifikációs eljárás hatékonyságát összehasonlítva azt tapasztalták, hogy a vitifikációs eljárás minden szempontból (szövettan, tojástermelés, termékenység) eredményesebbnek bizonyult a petefészek tartósítására (*Liu et al., 2010*). Kutatócsoportjuk később sikeresen továbbfejlesztette a vitifikációs módszert, mely során az ivarszerveket tartalmazó akupunktúrás tűket műszalmába helyezték, így a könnyebb azonosítás által az eljárás jobban megfelelt a génbanki tárolás feltételeinek (*Liu et al., 2012*). Ezt követően kutatásainkkal párhuzamosan a módszert sikeresen alkalmazták házityúk-petefészek mélyhűtéses tartósítására is, sőt, a transzplantációt követően donor eredetű utódokat is sikerült produkálniuk (*Liu et al., 2013b*). Ennek köszönhetően Kanadában és az USA-ban, napjainkban ezt a módszert alkalmazzák a madár ivarszerv-szövetek tárolásához a génmegőrzési programokban.

5.3. Új tudományos eredmények

1. Bebizonyítottam, hogy a pellet-módszer a klasszikus lassú, programozott eljáráshoz hasonlóan eredményesen használható fogolyszínű magyar tyúk esetében, ezért alkalmazható olyan ritka, veszélyeztetett őshonos tyúkfajták esetében is ahol kevesebb ondómennyiséggel kell számolni és/vagy nem áll rendelkezésre mélyhűtő berendezés.
2. Elsőként sikerült olyan ondómélyhűtési eljárást kidolgoznom gyöngytyúk spermiumok tartósítására, melynek alkalmazásával 63,6%-os termékenységet sikerült elérni, elősegítve ezzel a faj *in vitro* génmegőrzését.
3. Igazoltam, hogy lúdfaj esetében közel 60%-os termékenység érhető el a laboratóriumunk által gúnárondő mélyhűtésére kifejlesztett nitrogéngőzös eljárással. A mélyhűtési módszerrel tartósított ondóval való inszeminálás megközelítette a friss, hígított ondóval történő mesterséges termékenyítés eredményességét.
4. Megállapítottam, hogy mindhárom baromfifaj esetében a mélyhűtött ondóval való termékenyítések után a nagyon korai, petevezetőben történő embrióelhalások aránya nő meg az összes embrióelhalás közül a friss, hígított ondóval történő inszeminálásokhoz képest.
5. Igazoltam, hogy mindkét ivarban a korai ivarszerv-szövetek mélyhűtésével megőrizhető az ivarszervek szerkezeti épsége, melyet mind a szövettani, mind a szövettenyésztségi vizsgálatok alátámasztottak.

6. ÖSSZEFOGLALÁS

A biodiverzitás fontosságának felismerése és megőrzésének szükségessége világszerte genom- és adatbankok létrehozását indukálta. Az *in situ* és az *ex situ in vivo állományok* fenntartása mellett a genetikai diverzitás biztonságos megőrzése érdekében *ex situ in vitro* génbankok kialakítása szükséges, melyekben - egyéb genetikai minták mellett - az ezen állományokból származó ritka, értékes genetikai anyagot hordozó hím- és női ivarsejteket mélyhűtött állapotban, hosszútávon őrzik.

A hímivar genetikai állományának biztonságos megőrzési módja az ondó mélyhűtéses tartósítása. Jelenleg a baromfifajok közül csupán a házityúk-faj ondómélyhűtésével kapcsolatban találhatunk ajánlott mélyhűtési protokollokat a génbankok kialakítását célzó FAO ajánlásban (FAO, 2012). A többi baromfifaj esetében - helytelenül - a házi tyúknál használt protokollok alkalmazását javasolja a leírás, annak ellenére, hogy az elmúlt pár évtized kutatásai alapján nyilvánvalóvá vált, hogy *fajspecifikus mélyhűtési protokollokat* kell kidolgozni. Mivel a szakirodalomban található mélyhűtési kísérletek ellenére nincs egységes protokoll a különböző fajok ondómélyhűtésével kapcsolatban, ezért fontosnak tartottuk a különböző mélyhűtési eljárások hatékonyságának összehasonlítását.

A kutatásaink során olyan ondómélyhűtési eljárások kidolgozását céloztuk három baromfifaj esetében (*házi tyúk, gyöngytyúk, házi lúd*), melyek hatékonyan alkalmazhatók intézetünk *in vitro* génbanki munkájában, segítve a nemzeti baromfi spermabank kialakítását. Ezzel párhuzamosan törekedtünk az egyes fajok számára *gyakorlati szempontból* is ideális protokollok kidolgozására. Mindhárom faj esetében különböző mélyhűtési eljárások hatékonyságát teszteltük *in vitro* és *in vivo* módszerekkel.

A **házi tyúk-fajon** végzett ondómélyhűtési kísérleteink során a FAO által ajánlott klasszikus glicerolos eljárás hatékonyságát kívántuk elérni a pellet-módszerrel. *In vitro* vizsgálataink során nem találtunk szignifikáns eltérést az élő, normális morfológiájú spermiumok túlélésében a két eljárás között, ennek köszönhetően a kétféle módon mélyhűtött/felolvasztott mintákkal való termékenyítéseket követően a két csoport termékenysége között sem volt szignifikáns különbség. Mivel az általunk kidolgozott egyszerűsített és gyors pellet-módszer a klasszikus lassú, programozott eljáráshoz hasonlóan hatékonyan bizonyult tyúkfaj esetében, ezért olyan ritka, veszélyeztetett tyúkfajták esetében javasoljuk a módszer alkalmazását, ahol kevesebb egyeddel és/vagy kisebb ondómennyiséggel kell számolni, illetve olyan esetekben, amikor nem áll rendelkezésre programozható mélyhűtőberendezés.

Mivel a **gyöngytyúkfaj** ondómélyhűtésével - tudomásunk szerint- a világon csupán egy francia kutatócsoport és a mi laboratóriumunk foglalkozik, ezért pillanatnyilag a spermabanki

tárolás céljainak megfelelő mélyhűtési protokoll még váratott magára. Ennek kidolgozása érdekében kétféle (lassú, ill. gyors) programozott, a nitrogéngőzös, valamint a pellet-módszer összehasonlításával kívántunk a faj sajátosságainak leginkább megfelelő protokollt kidolgozni. Kísérletünkben a spermiumok a lassú, programozott és a pellet-módszer esetében eredményezték a legmagasabb túlélést az élő normális morfológiájú sejtekre vonatkoztatva. Utóbbival szignifikánsan jobb túlélési arányt értünk el, ezért a módszer *in vivo* tesztelése, azaz a termékenyítési kísérletek során a pellet-módszerrel mélyhűtött spermiumokkal a világon elsőként 63,6%-os termékenységet sikerült elérnünk gyöngytyúkfajban.

A ***házilúd-fajjal*** kapcsolatos ondómélyhűtési kísérleteinkben a programozott módszert hasonlítottuk össze az egyszerűbben kivitelezhető nitrogéngőzös eljárással, emellett különböző krio- és ozmoprotektánsok hatását is vizsgáltuk. Mivel *in vitro* vizsgálataink szerint az ozmoprotektánsok nem javítottak a túlélési eredményeken, valamint a programozott és nitrogéngőzös módszer között nem volt szignifikáns különbség a normális morfológiájú spermiumok túlélésében, ezért az egyszerűbben kivitelezhető nitrogéngőzös eljárással mélyhűtött ondómintákkal végeztünk termékenyítési kísérleteket. Az általunk mélyhűtött gúnáronddóval közel 60%-os termékenységet sikerült elérni. Vizsgálataik alapján megállapítható, hogy a lúdfaj ondómélyhűtésére a nitrogéngőzös eljárás a programozott protokollokhoz hasonlóan alkalmas. A génmegőrzési hasznosítás mellett az eljárás a hétköznapi tenyésztői munkába is beilleszthető, különösen a tenyészállományok előállításánál.

A hímivar genetikai állományának megőrzése az ondómélyhűtéssel biztosítható, azonban a nőivar esetében erre egyedüli megoldást pillanatnyilag csak a naposkori petefészekszövet mélyhűtése, majd az így konzervált ivarszerv azonos korú recipiens állatokba való beültetése jelenthet. A módszer génmegőrzési programokban való alkalmazásához azonban még váratott magára egy hatékony, egyszerűen alkalmazható mélyhűtési eljárás kidolgozása. Ennek érdekében kísérleteink során igyekeztünk különböző mélyhűtési technikákat (nitrogéngőzben történő mélyhűtés, pellet-módszer, illetve vitrifikációs eljárás) kidolgozni házi tyúk *korai ivarszerv-szöveiteinek* hatékony tartósítására.

A különböző eljárásokkal mélyhűtött naposkori herék szövettani vizsgálata során azt tapasztaltuk, hogy a vitrifikációs eljárás őrizte meg leginkább a herék eredeti szerkezetét. Ezért a hereszövet fenti eljárással történő mélyhűtése, mint alternatív génmegőrzési módszer lehetővé teszi a veszélyeztetett fajok esetében az értékes hímek genetikai állományának megőrzését. A módszer alkalmazását olyan nagy genetikai értékű hímek esetében javasolt, ahol az ondó mélyhűtése valamilyen okból nem kivitelezhető.

A naposkori petefészekszövetek esetében mindhárom mélyhűtési eljárás megőrizte a szervek normális szerkezetét. A mélyhűtött ivarszervek épségét a szövettani és szövettenyésztési

vizsgálatainkkal is alátámasztottuk, mely igazolta, hogy a naposkori ivarszervek túléltek a mélyhűtés/felolvasztás procedúráját. A minták könnyebb kezelése és azonosítása miatt génmegőrzési célból a vitrifikációs eljárás alkalmazását javasoljuk.

Az *in vitro* génmegőrzést elősegítő vizsgálataink során hatékony ondómélyhűtési protokollt sikerült kidolgoznunk három baromfifaj (házi tyúk, gyöngytyúk, házi lúd) esetében a spermabanki tárolás számára, valamint közelebb kerültünk a női genom megőrzéséhez is a korai petefészekszövetek mélyhűtésének adaptálásával házityúk-fajra.

7. SUMMARY

The importance of biodiversity and gene conservation needs to create gene- and databanks of the various animal species all over the world. It is well known that for safe maintenance of valuable genes, creation of both *in situ* and *ex situ in vivo & in vitro* gene banks are necessary. In the *in vitro* gene banks cryopreserved spermatozoa and oocytes - and/or other genetic materials - are stored for long term.

Semen cryopreservation is a reliable conservation way of the haploid male genetic material. Presently, in FAO guideline - regarding gene banks - only in the case of domestic fowl are references for advanced freezing protocols (FAO, 2012). Although, it is evident that species specific freezing protocols are needed for the various avian species, considering the other poultry species those freezing protocols are still recommended, which are developed for chicken sperm. Due to the above mentioned insufficiency it is important to compare the efficiency and develop freezing protocols for other species as well.

The aim of our study was to create such ideal freezing protocols for three poultry species (*domestic fowl, guinea fowl, domestic geese*), which are adaptable for the national poultry sperm bank, as well as take account of practical aspects, too. The efficiency of different freezing protocols was tested using both *in vitro* and *in vivo* methods.

The aim of the present cryopreservation study on *domestic fowl* sperm was to achieve the efficiency of the classical programmable freezing protocol recommended by FAO with a newly modified pellet-method. According to the *in vitro* results no significant differences were found between the two protocols in the survival rate of live, normal spermatozoa. Therefore, no significant differences were found in fertility, either. Since the efficiency of the simplified and fast pellet-method was similar than that of the classical, slow programmable protocol, the application of pellet-method is recommended in the case of rare, endangered species, which produce either lower sperm volume or there is no programmable freezing machine available.

According to our knowledge trials on cryopreservation of *guinea fowl* sperm are made only by French and our Hungarian research groups, so the sufficient freezing protocol of guinea fowl sperm for long term storage was still lacking. For creating the most efficient freezing protocol of the species two different programmable (slow and fast) protocols, a nitrogen vapour and a pellet-method were compared. In the present study the slow programmable and the pellet-method produced the highest survival rate of live, normal spermatozoa. Between them significantly higher survival rate was found by the pellet-method. In *in vivo* comparison of the two most efficient protocols pellet-method resulted 63.6%, while slow programmable protocol

only 29.2% fertility. According to the existing data of the special literature the above higher fertility rate using cryopreserved guinea fowl sperm was the highest in the world, up to that time.

In the cryopreservation study of *domestic geese* sperm programmable methods were compared with the more practical nitrogen vapour methods, using different cryo- and osmoprotectants. According to the *in vitro* results osmoprotectants could not improve the sperm survival in any cases and there were no significant differences between the programmable and nitrogen vapour methods in the survival rate of live, intact spermatozoa, either. Therefore fertility examinations were made only with frozen/thawed sperm originating from the most simple and practical nitrogen vapour method, by which near 60% fertility rate was achieved. According to the present findings the nitrogen vapour method - similarly to some programmable protocols - is also efficient for gander sperm freezing. The method is applicable not only for gene conservation purposes but also in goose breeding practice, especially in the case of breeding stocks of higher level.

Preservation of male genetic material can be covered using frozen semen, however usage of *testicular tissue* can be an alternative method for conservation of male genome of endangered poultry species, as well. Application of this method is recommended in the case of some genetically valuable males, where the sperm preservation is not accomplishable due to any reasons.

In the case of female gamete, cryopreservation and transfer of frozen/thawed *ovarian tissues* to the recipients is the only solution for conservation purposes. Elaboration of an efficient, practical freezing method applicable for gene banks was still lacking. Therefore, different cryopreservation methods (freezing in cryotube in nitrogen vapour, in pellet form and with a special vitrification) of early gonadal tissues of domestic fowl were tested, as well.

Histological examinations of one day old *testes* frozen by different protocols showed that the normal structure was most perfectly preserved in the case of the special vitrification procedure.

The normal structure of the frozen/thawed *ovaries* of day old chicken was preserved in all case of the mentioned three different freezing methods. Intact character of frozen/thawed ovaries was confirmed by both histological and tissue culture examinations, thus it is verified that the early ovaries survived the cryopreservation procedure. Due to the easier handling and identification of samples vitrification method can be recommended for gene preservation purpose.

In the present studies on *in vitro* gene conservation efficient alternative species specific sperm freezing protocols were elaborated in three poultry species (domestic fowl, guinea fowl and domestic geese), as well as, by adaptation and development of the cryopreservation of early

ovarian tissues of domestic fowl the conservation of avian female genome became accessible for the future.

8. MELLÉKLETEK

M1. Irodalomjegyzék

1. **Abouelezz, F.M.K., Castaño, C., Toledano-Diaz, A., Estes, M.C., López-Sebastián, A., Campo, J.L., Santiago-Moreno, J.** (2015): Effect of the Interaction Between Cryoprotectant Concentration and Cryopreservation Method on Frozen/Thawed Chicken Sperm Variables. *Reproduction in Domestic Animals*, 50 135-141. p.
2. **Aire, T.A.** (2007): Anatomy of the testis and male reproductive tract. In: *Jamieson B.G.M. (ed): Reproductive Biology and Phylogeny of birds I. Science Publishers, Enfield, Jersey, Plymouth*, 37-114. p.
3. **Amann, R.P. and Pickett, B.W.** (1987): Principles of cryopreservation and a review of the cryopreservation of stallion spermatozoa. *Journal of Equine Veterinary Science*, 7 145-173. p.
4. **Anderson, R.A., Wallace, W.H.B., Baird, D.T.** (2008): Ovarian cryopreservation for fertility preservation: indications and outcomes. *Reproduction*, 136 681-689. p.
5. **Babarczy, B.** (2015): Az inszeminált spermiumszám és az embriófejlődés összefüggései házityúk-fajban. *TDK dolgozat. Szent István Egyetem.*
6. **Bakst, M.R. and Sexton, T.J.** (1979): Fertilizing capacity and ultrastructure of fowl and turkey spermatozoa before and after freezing. *Journal of Reproduction and Fertility*, 55 1-7. p.
7. **Bakst, M.R., Wishart, G.J., Brillard, J.P.** (1994): Oviductal sperm selection, transport and storage in poultry. *Poultry Science Reviews*, 5 117-143. p.
8. **Bakst, M. R., Donoghue, A. M., Yoho, D.E., Moyle, J.R., Whipple, S.M., Camp, M.J., Liu, G.Q., Bramwell, R.K.** (2010): Comparisons of sperm storage tubule distribution and number in 4 strains of mature broiler breeders and in turkey hens before and after the onset of photostimulation. *Poultry Science*, 89 986-992. p.
9. **Barna, J., Végi, B., Váradi, É.** (2008): Comparison of various freezing protocols of native roosters' semen. *Reproduction in Domestic Animals*, 43 (3) 139. p.
10. **Barna, J., Végi, B., Váradi, É., Szóke, Zs., Péczely, P.** (2009): Studies related to fertility in broiler breeders. *XXI International Poultry Symposium PB WPSA. 7-9 Sept 2009. Wroclaw – Szklarska Poreba, Poland.* 18-23. p.
11. **Barna, J., Végi, B., Váradi, É., Liptói, K.** (2010): Comparative study on cryopreservation procedures of gander sperm. *Proc. XIII European Poultry Conference, 23-27 August 2010. Tours, France. World's Poultry Science Journal*, 66 508. p.

12. **Barna, J., Váradi, É., Drobnyák Á.** (2013): Trials on chicken sperm vitrification. *CRYOBIRD Final Meeting, 15-16 October 2013 St Malo, France.*
13. **Barna, J., Liptói, K., Patakiné Várkonyi, E., Váradi, É., Sztán, N.** (2014): Hazai baromfi *in vitro* génbank kialakítása Gödöllőn. *Proc. 20. Szaporodásbiológiai találkozó, 2014. 11. 07-08. Herceghalom*, 16. p.
14. **Bellagamba, F., Cerolini, S., Cavalchini, L.G.** (1993): Cryopreservation of poultry semen: a review. *World's Poultry Science Journal*, 49 157-166. p.
15. **Bessei, W.** (1989): Preservation of local poultry stocks. In: *Genotype X environment interactions in poultry production. Report of a meeting, Colloques de l'INRA. 9-11 May 1989. Jouy-es-Josas, France*, 50 175-188. p.
16. **Bielefeldt, U.** (1985): Zur künstlichen Besamung beim Huhn unter Verwendung von Tiefgefriersperma und der intravaginalen Besamungstechnik. *Berlin, Freie Univ, Vet Diss. Berlin, FU*, 136. p.
17. **Blackburn, H.D.** (2006): The National Animal Germplasm Program: Challenges and Opportunities for Poultry Genetic Resources. *Poultry Science*, 85 210-215. p.
18. **Blanch, E., Tomás, C., Casares, I., Gómez, E.A., Sansano, S., Giménez, I., Mocé, E.** (2014): Development of methods for cryopreservation of rooster sperm from endangered breed „Gallina Valenciana de Chulilla” using low glycerol concentrations. *Theriogenology*, 81 1174-1180. p.
19. **Blanco, J.M., Gee, G., Wildt, D.E., Donoghue, A.M.** (2000): Species variation in osmotic, cryoprotectant and cooling rate tolerance in poultry, eagle and falcon spermatozoa. *Biology of Reproduction*, 63 1164-1171. p.
20. **Blanco, J.M., Wildt, D.E., Höfle, U., Voelker, W., Donoghue, A.M.** (2009): Implementing artificial insemination as an effective tool for *ex situ* conservation of endangered avian species. *Theriogenology*, 71 200-213. p.
21. **Blanco, J.M., Long, J.A., Gee, G., Wildt, D.E., Donoghue, A.M.** (2011): Comparative cryopreservation of avian spermatozoa: benefits of non-permeating osmoprotectants and ATP on turkey and crane sperm cryosurvival. *Animal Reproduction Science*, 123 242-248. p.
22. **Blanco, J.M., Long, J.A., Gee, G., Wildt, D.E., Donoghue, A.M.** (2012): Comparative cryopreservation of avian spermatozoa: Effects of freezing and thawing rates on turkey and sandhill crane sperm cryosurvival. *Animal Reproduction Science*, 131 1-8. p.
23. **Blesbois, E. and Labbé, C.** (2003): Main improvements in semen and embryo cryopreservation for fish and fowl. In: *Planchenault (Ed): Cryopreservation of Animal Genetic Resources in Europe. Paris, Bureau des Ressources Génétiques*. 55-66. p.

24. **Blesbois, E., Grasseau, I., Seigneurin, F.** (2005): Membrane fluidity and the ability to survive cryopreservation in domestic bird spermatozoa. *Reproduction*, 129 371-378. p.
25. **Blesbois, E.** (2006): Advances in avian semen cryopreservation. *Proc. XII European Poultry Conference, 10-14 September 2006. Verona, Italy. World's Poultry Science Journal* 62 519. p.
26. **Blesbois, E.** (2007): Current status in avian semen cryopreservation. *World's Poultry Science Journal*, 63 213-222. p.
27. **Blesbois, E., Seigneurin, F., Grasseau, I., Limouzin, C., Besnard, J., Gourichon, D., Coquérelle, G., Rault, P., Tixier-Boichard, M.** (2007): Semen Cryopreservation for Ex Situ Management of Genetic Diversity in Chicken: Creation of the French Avian Cryobank. *Poultry Science*, 86 555-564. p.
28. **Blesbois, E., Grasseau, I., Seigneurin, F., Mignon-Grasteau, S., Saint Jalme, M., Mialon-Richard, M.M.** (2008): Predictors of success of semen cryopreservation in chicken. *Theriogenology*, 69 252-261. p.
29. **Blesbois, E.** (2011): Freezing avian semen. *Avian Biology Research*, 4 52-58. p.
30. **Boa-Amponsem, K., Scherf, B., Hoffmann, I.** (2004): Utilisation and conservation of poultry genetic resources: FAO Initiatives. *World Poultry Congress, June 8-12, Istanbul, Turkey. CD Proceedings*.
31. **Boerke, A., Dieleman, S.J., Gadella, B.M.** (2007): A possible role for sperm RNA in early embryo development. *Theriogenology*, 68 (1) 147-155. p.
32. **Bordes, A., Lornage, J., Demirci, B., Franck, M., Courbiere, B., Guerin, J.F., Salle, B.** (2005): Normal gestations and live births after orthotopic autograft of vitrified-warmed hemi-ovaries into ewes. *Human Reproduction*, 20 2745-2748. p.
33. **Brard, E. and Benoit, J.** (1969): Sterilization of quails by x-rays and inter-racial gonad grafts. *Bulletin biologique de la France et de la Belgique*, 103 (3) 313-321. p.
34. **Brillard, J. P.** (1993): Sperm storage and transport following natural mating and artificial insemination. *Poultry Science*, 72 923-928. p.
35. **Brock, M.K. and Bird, D.M.** (1991): Prefreeze and postthaw effects of glycerol and dimethylacetamide on motility and fertilizing ability of american kestrel (*Falco sparverius*) spermatozoa. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, 22 453-459. p.
36. **Burrows, W.H., and Quinn, J.P.** (1937): The collection of spermatozoa of domestic fowl and turkey. *Poultry Science*, 16 19-24. p.
37. **Buss, E.G.** (1993): Cryopreservation of rooster sperm. *Poultry Science*, 72 944-954. p.

38. **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. p.
39. **Chen, S.U., Chien, C.L., Wu, M.Y., Chen, T.H., Lai, S.M., Lin, C.W., Yang, Y.S.** (2006): Novel direct cover vitrification for cryopreservation of ovarian tissues increases follicle viability and pregnancy capacity in mice. *Human Reproduction*, 21 2794-2800. p.
40. **Choi, J., Lee, J.Y., Lee, E., Yoon, B.K., Bae, D., Choi, D.** (2007): Cryopreservation of the mouse ovary inhibits the onset of primordial follicle development. *Cryobiology*, 54 55-62. p.
41. **Christensen, V.L., Fairchild, B.D., Ort, D.T.** (2005): The Relationship Between Sperm Hydrolysis of the Perivitelline Layer and Embryonic Livability. *Journal of Applied Poultry Research*, 14 60-68. p.
42. **Clulow, J. and Jones, R.C.** (1982): Production, transport, maturation, storage and survival of spermatozoa in the male Japanese quail, *Coturnix coturnix*. *Journal of Reproduction and Fertility*, 64 259-266. p.
43. **Davenport, C.B.** (1911): The transplantation of ovaries in chickens. *Journal of Morphology*, 22 111-122. p.
44. **Deanesly, R.** (1954): Immature rat ovaries grafted after freezing and thawing. *Journal of Endocrinology*, 11 197-200. p.
45. **Demeestere, I., Simon, P., Emiliani, S., Delbaere, A., Englert, Y.** (2007): Fertility preservation: successful transplantation of cryopreserved ovarian tissue in a young patient previously treated for Hodgkin's disease. *Oncologist*, 12 1437-1442. p.
46. **Donoghue, A.M. and Wishart, G.J.** (2000): Storage of poultry semen. *Animal Reproduction Science*, 62 213-232. p.
47. **Dubos, F., Lemoine, M., Seigneurin, F., Mialon-Richard, M.M., Grasseau, I., Guy, G., Blesbois, E.** (2008): Cryopreservation of landese gander semen. *Proc. XXIII. World's Poultry Congress. 30 June- 4 July 2008, Brisbane, Australia. World's Poultry Science Journal*, 64 (2) 147. p.
48. **Duplaix, M. and Sexton, T.J.** (1984): Effects of type of freeze straw and thaw temperature on the fertilizing capacity of frozen chicken semen. *Poultry Science*, 63 775-780. p.
49. **Ehling, C., Taylor, U., Baulain, U., Weigend, S., Henning, M., Rath, D.** (2012): Cryopreservation of semen from genetic resource chicken lines. *Agriculture and Forestry Research*, 62 151-158. p.

50. **Eyal-Giladi, H. and Kochav, S.** (1976): From cleavage to primitive streak formation: a complementary normal table and a new look at the first stages of the development of the chick. *Developmental Biology*, 19 321-337. p.
51. **FAO** (1998): Secondary guidelines for development of national farm animal genetic resources management plants: management of small populations at risk. *Rome: FAO* 215 p.
52. **FAO** (2012): Cryoconservation of animal genetic resources. *FAO Animal Production and Health Guidelines, No. 12 Rome*.
53. **Ferrier, W.T., Ortmayer, H.B., Ogasawara, F.X., Yamamoto, R.** (1982): The survivability of *Mycoplasma meleagridis* in frozen-thawed turkey semen. *Poultry Science*, 61 379-381. p.
54. **Gandolfi, F., Paffoni, A., Papasso Brambilla, E., Bonetti, S., Brevini, T.A., Ragni, G.** (2006): Efficiency of equilibrium cooling and vitrification procedures for the cryopreservation of ovarian tissue: comparative analysis between human and animal models. *Fertility and Sterility*, 85 1150-1156. p.
55. **Gee, G.F., Bakst, M.R., Sexton, T.J.** (1985): Cryogenic preservation of semen from the greater sandhill crane. *Journal of Wildlife Management*, 49 480-484. p.
56. **Gee, G.F., Morrell, C.A., Franson, J.C., Pattee, O.H.** (1993): Cryopreservation of american kestrel semen with dimethylsulfoxide. *Journal of Raptor Research*, 27 21-25. p.
57. **Gee, G.F.** (1995): Artificial insemination and cryopreservation of semen from nondomestic birds. In: *Bakst, M.R. and Wishart, G.J. (Eds.): Proceedings First Symposium on the Artificial Insemination in Poultry. Poultry Science Association, Savoy, Illinois, USA.* 262-279. p.
58. **Gerzilov, V.** (2010): Influence of various cryoprotectants on the sperm mobility of Muscovy semen before and after cryopreservation. *Agricultural Science and Technology*, 2 57-60. p.
59. **Gill, S.P.S., Buss, E.G., Mallis, R.J.** (1996): Cryopreservation of Rooster Semen in Thirteen and Sixteen Percent Glycerol. *Poultry Science*, 75 254-256. p.
60. **González-Morán, M.G.** (2011): Histological and stereological changes in growing and regressing chicken ovaries during development. *The Anatomical Record*, 294 893-904. p.
61. **Graham, E.F., Schmehl, M.L., Deyo, R.C.M.** (1984): Cryopreservation and fertility of fish, poultry and mammalian spermatozoa. *Proc. 10th technical conference on artificial insemination and reproduction, National Association of Animal Breeders, 12-14 April, Milwaukee, USA.* 4-29. p.

62. **Grossman, M. and Siegel, P.B.** (1966): Orthotopic ovarian transplants in chickens. *Poultry Science*, 45 1434-1436. p.
63. **Gunasena, K.T., Villines, P.M., Critser, E.S., Critser, J.K.** (1997a): Live births after autologous transplant of cryopreserved mouse ovaries. *Human Reproduction*, 12 101-106. p.
64. **Gunasena, K.T., Lakey, J.R.T., Villines, P.M., Critser, E.S., Critser, J.K.** (1997b): Allogeneic and Xenogeneic Transplantation of Cryopreserved Ovarian Tissue to Athymic Mice. *Biology of Reproduction*, 57 226-231. p.
65. **Gurthie, C.C.** (1908): Further result of transplantation of ovaries in chickens. *Journal of Experimental Zoology*, 5 563-576. p.
66. **Hammerstedt, R.H., Graham, J.K., Nolan, J.F.** (1990): Cryopreservation of mammalian sperm: What we ask them to survive. *Journal of Andrology*, 11 73-88. p.
67. **Hammerstedt, R.H. and Graham, J.K.** (1992): Cryopreservation of poultry sperm: the enigma of glycerol. *Cryobiology*, 29 26-38. p.
68. **Hammerstedt, R.H.** (1995): Cryopreservation of Poultry Semen – Current status and Economics. In: *Proceedings First International Symposium on the Artificial Insemination of Poultry*. Poultry Science Association, Savoy, Illinois, USA. 229-250. p.
69. **Han, X.F., Niu, Z.Y., Liu, F.Z., Yang, C.S.** (2005): Effects of Diluents, Cryoprotectants, Equilibration Time and Thawing Temperature on Cryopreservation of Duck Semen. *International Journal of Poultry Science*, 4 197-201. p.
70. **Hanzawa, S., Niinomi, T., Takahashi, R., Yamaguchi, K., Miyata, T., Tajima, A.** (2006): New method of freezing chicken semen using N-methyl-acetamide as cryoprotecting agent. *Proc. XII European Poultry Conference, Verona, Italy 10-14 September 2006*. *World's Poultry Science Journal*, 62 519. p.
71. **Harnos, A. és Reiczigel, J.** (2006): Biostatistika és kísérlettervezés. www.univet.hu/users/zslang/phd/kis-terv--elemszam--transzform.pdf 14. p.
72. **Harris, G.C., Thurston, R.J., Cundall, J.** (1973): Changes in the ultrastructure of the fowl spermatozoon due to rapid freeze-thaw. *Journal of Reproduction and Fertility*, 34 389-394. p.
73. **Hartley, P.S., Dawson, B., Lindsay, C., McCormick, P., Wishart, G.** (1999): Cryopreservation of Houbara Semen: A Pilot Study. *Zoo Biology*, 18 147-152. p.
74. **Hoffmann, I.** (2005): Research and investment in poultry genetic resources - challenges and options for sustainable use. *World's Poultry Science*, 61 57-70. p.
75. **Holt, V.W.** (2000): Basic aspects of frozen storage of semen. *Animal Reproduction Science*, 62 3-22. p.

76. **Hovatta, O., Foudila, T., Sieberg, R., Johansson, K., von Smitten, K., Reima, I.** (1996): Pregnancy resulting from intracytoplasmic injection of spermatozoa from a frozen-thawed testicular biopsy specimen. *Human Reproduction*, 11 2472-2473. p.
77. **Howarth, B.** (1971): An examination for sperm capacitation in the fowl. *Biology of Reproduction*, 3 338-341. p.
78. **Hübner, R. und Schramm, G.P.** (1988): Untersuchungen über die kryoprotektive Eignung von Äthylenglykol und Dimethylacetamid zur Tiefgefrierkonservierung von Hahnensperma. *Monatshefte für Veterinärmedizin*, 43 (8) 279-282. p.
79. **Iaffaldano, N., Romagnoli, L., Manchisi, A., Rosato, M.P.** (2011): Cryopreservation of turkey semen by pellet method: Effects of variables such as the extender, cryoprotectant concentration, cooling time and warming temperature on sperm quality determined through principal component analysis. *Theriogenology*, 76 794-801. p.
80. **Isachenko, V., Isachenko, E., Reinsberg, J., Montag, M., van der Ven, K., Dorn, C., Roesing, B., van der Ven, H.** (2007): Cryopreservation of human ovarian tissue: comparison of rapid and conventional freezing. *Cryobiology*, 55 261-268. p.
81. **Isachenko, E., Isachenko, V., Weiss, J.M., Kreienberg, R., Katkov, I.I., Schulz, M., Lulat, A.G-M.I., Risopatrón, M.J., Sánchez, R.** (2008): Acrosomal status and mitochondrial activity of human spermatozoa vitrified with sucrose. *Reproduction Research*, 136 167-173. p.
82. **Kagabu, S. and Umezu, M.** (2000): Transplantation of cryopreserved mouse, Chinese hamster, rabbit, Japanese monkey and rat ovaries into rat recipients. *Experimental Animals*, 49 17-21. p.
83. **Keros, V., Xella, S., Hultenby, K., Pettersson, K., Sheikhi, M., Volpe, A., Hreinsson, J., Hovatta, O.** (2009): Vitrification versus controlled-rate freezing in cryopreservation of human ovarian tissue. *Human Reproduction*, 24 1670-1683. p.
84. **Kim, G.A., Kim, H.Y., Kim, J.W., Lee, G., Lee, E., Lim, J.M.** (2010): Ultrastructural deformity of ovarian follicles induced by different cryopreservation protocols. *Fertility and Sterility*, 94 1548-1550. p.
85. **Kosenko, O.V.** (2007): Orthotopic Transplantation of Donor Ovary as an Alternative Method of Artificial Reproduction of Fowl. *Russian Agricultural Science*, 43 189-192. p.
86. **Kowalczyk, A. and Łukaszewicz, E.** (2012): The possibility of obtaining intergeneric hybrids via White Koluda (*Anser anser L.*) goose insemination with fresh and frozen-thawed Canada goose (*Branta canadensis L.*) gander semen. *Theriogenology*, 77 507-513. p.

87. **Kowalczyk, A., Łukaszewicz, E., Rzońca, Z.** (2012): Successful preservation of capercaillie (*Tetrao urogallus L.*) semen in liquid and frozen states. *Theriogenology*, 77 899-907. p.
88. **Kurbatov, A.D., Narubina, L., Bublinaeva, G., Tselutin, K.** (1984): Cryopreservation of cock semen. *Pticevodstvo*, 11 28-29. p.
89. **Lake, P.E.** (1968a): Observation on freezing fowl spermatozoa in liquid nitrogen. *6th International Congress of Animal Reproduction and Artificial Insemination. 22-26 July, 1968 Paris, France.* 1633-1635. p.
90. **Lake, P.E.** (1968b): Observation of freezing fowl spermatozoa in liquid nitrogen. *Proc. 14th World Poultry Congress, 6-12 September 1968, Madrid, Spain.* 279-282. p.
91. **Lake, P.E. and Stewart, J.M.** (1978): Preservation of fowl semen in liquid-nitrogen - improved method. *British Poultry Science*, 19 (2) 187-194. p.
92. **Lake, P.E., Ravie, O., McAdam, J.** (1981): Preservation of fowl semen in liquid nitrogen: application to breeding programmes. *British Poultry Science*, 22 71-77. p.
93. **Lake, P.E.** (1986): The history and future of the cryopreservation of avian germ plasma. *Poultry Science*, 65 1-15. p.
94. **Lee., S., Iwasaki, Y., Shikina, S., Yoshizaki, G.** (2013): Generation of functional eggs and sperm from cryopreserved whole testes. *Proceedings of National Academy of Sciences*, 110: 1640-1645. p.
95. **Leibo, S.P., Martino, A., Kobayashi, S., Pollard, J.W.** (1996): Stage-dependent sensitivity of oocytes and embryos to low temperatures. *Animal Reproduction Science*, 42 45-53. p.
96. **Liptói, K., Varga, Á., Hidas, A., Barna, J.** (2004): Detection of the rate of true fertility in duck breeds by the combination of two in vitro methods. *Acta Veterinaria Hungarica*, 52 227-233. p.
97. **Liu, L., Wood, G.A., Morikawa, L., Ayearst, R., Fleming, C., McKerlie, C.** (2008): Restoration of fertility by orthotopic transplantation of frozen adult mouse ovaries. *Human Reproduction*, 23 122-128. p.
98. **Liu, J., Song, Y., Cheng, K.M., Silversides, F.G.** (2010): Production of Donor-Derived Offspring from Cryopreserved Ovarian Tissue in Japanese Quail (*Coturnix japonica*). *Biology of Reproduction*, 83 15-19. p.
99. **Liu, J., Cheng, K.M., Silversides, F.G.** (2012): Novel needle-in-straw vitrification can effectively preserve the follicle morphology, viability, and vascularization of ovarian tissue in Japanese quail (*Coturnix japonica*). *Animal Reproduction Science*, 134 197-202. p.

100. **Liu, J., Cheng, K.M., Silversides, F.G.** (2013a): A model for cryobanking female germplasm in Japanese quail (*Coturnix japonica*). *Poultry Science*, 92 2772-2775. p.
101. **Liu, J., Robertson, M.C., Cheng, K.M., Silversides, F.G.** (2013b): Chimeric plumage coloration produced by ovarian transplantation in chickens. *Poultry Science*, 92 1073-1076. p.
102. **Liu, J., Cheng, K.M., Silversides, F.G.** (2013c): Fundamental principles of cryobiology and application to *ex situ* conservation of avian species. *Avian Biology Research*, 6 187-197. p.
103. **Long, J.A.** (2006): Avian semen cryopreservation: what are the biological challenges. *Poultry Science*, 85 232-236. p.
104. **Long, J.A., Purdy, P.H., Zuidberg, K., Hiemstra, S.J., Velleman, S.G., Woelders, H.** (2014): Cryopreservation of turkey semen: Effect of breeding line and freezing method on post-thaw sperm quality, fertilization, and hatching. *Cryobiology*, 68 371-378. p.
105. **Łukaszewicz, E.** (2001): DMF effects on frozen gander semen. *British Poultry Science*, 42 308-314. p.
106. **Łukaszewicz, E.** (2002): An effective method for freezing White Italian gander semen. *Theriogenology*, 58 19-27. p.
107. **Łukaszewicz, E., Kruszynski, W., Fujihara, N.** (2003): Effect of age on quality of fresh and frozen-thawed semen in ganders. *Asian Journal of Andrology*, 5 89-93. p.
108. **Łukaszewicz, E., Chrzanowska, M., Jerysz, A., Chelmońska, B.** (2004): Attempts on freezing the Greylag (*Anser anser L.*) gander semen. *Animal Reproduction Science*, 80 163-173. p.
109. **MacPherson, J.W., Chatterjee, S., Friars, G.W.** (1969): Frozen turkey semen. *Canadian Journal of Comparative Medicine*, 33 37-38. p.
110. **Maeda, T., Terada, T., Tsutsumi, Y.** (1984): Comparative study of the effect of various cryoprotectants in preserving the morphology of frozen and thawed fowl spermatozoa. *British Poultry Science*, 25 547-553. p.
111. **Maksudov, G.Y. and Panchenko, V.G.** (2002): Obtaining an Interspecific Hybrid of Cranes by Artificial Insemination with Frozen-thawed Semen. *Biology Bulletin*, 29 311-314. p.
112. **Massip, A., Leibo, S.P., Blesbois, E.** (2004): Cryobiology of gametes and the breeding of domestic animals. In: *Benson, E., Fuller, B., Lane, N. (eds.): Life in the Frozen State*, Taylor and Francis Group, London (GBR). 12 371-392. p.

113. **Masuda, H., Soejima, J.M., Waide, Y.** (1974): Study on the deep freezing preservation of the chicken spermatozoa. *Bulletin of National Institute of Animal Industry*, 28 33-40. p.
114. **Mazur, P.** (2004): Principles of cryobiology. In: *Benson, E., Fuller, B., Lane, N. (eds.): Life in the Frozen State, Taylor and Francis Group, London (GBR).* 1 4-65. p.
115. **Merino, O., Sánchez, R., Risopatrón, M.J., Isachenko, E., Katkov, I.I., Figueroa, I., Valdebenito, I., Mallmann, P., Isachenko, V.** (2012): Cryoprotectant-free vitrification of fish (*Oncorhynchus mykiss*) spermatozoa: first report. *Andrologia*, 44 390-395. p.
116. **Migishima, F., Suzuki-Migishima, R., Song, S.Y., Kuramochi, T., Azuma, S., Nishijima, M., Yokoyama, M.** (2003): Successful Cryopreservation of Mouse Ovaries by Vitrification. *Biology of Reproduction*, 68 881-887. p.
117. **Morris, G.J., Acton, E.A., Murray, B.J., Fonseca, F.** (2012): Freezing injury: The special case of the sperm cell. *Cryobiology*, 64 71-80. p.
118. **Mortimer, R.G., Berndtson, M.E., Pickett, B.W., Ben, L.** (1976): Fertilizing of frozen bovine spermatozoa by packaged in continental straws or ampoules. *Journal of Dairy Science*, 59 1595-1598. p.
119. **Mphaphathi, M.L., Luseba, D., Sutherland, B., Nedambale, T.L.** (2012): Comparison of slow freezing and vitrification methods for Venda cockerel's spermatozoa. *Open Journal of Animal Sciences*, 2 204-210. p.
120. **Nawroth, F., Isachenko, V., Dessole, S., Rahimi, G., Farina, M., Vargiu, N., Mallman, P., Dattena, M., Capobianco, G., Perts, D., Orth, I., Isachenko, E.** (2002): Vitrification of human spermatozoa without cryoprotectants. *Cryo-Letters*, 23 93-102. p.
121. **Neville, W.J., Macpherson, J.W., Reinhart, B.** (1971): The contraceptive action of glycerol in chickens. *Poultry Science*, 50 1411-1415. p.
122. **Nirasawara, K., Takahashi, H., Furukawa, T., Kikuchi, K., Noguchi, J., Izaike, Y., Oishi, T.** (1995): Chicken Genetic Resources in Japan and New Evaluation Research. *3th MAFF (Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries) International Workshop on Genetic Resources. Animal Genetic Resources: Efficient Conservation and Effective Use. 5-7 Dec, 1995. Tsukuba, Japan.* 73-82. p.
123. **O'Brien, J.K., Oehler, D.A., Malowski, S.P., Roth, T.L.** (1999): Semen Collection, Characterization, and Cryopreservation in a Magellanic Penguin (*Spheniscus magellanicus*). *Zoo Biology*, 18 199-214. p.
124. **Oderkirk, A.H.F. and Buckland, R.B.** (1977): A comparison of diluents and cryopreservatives for freezing turkey semen. *Poultry Science*, 56 1861-1867. p.

125. **Olsen, M.W. and Neher, B.H.** (1984): The site of fertilization in the domestic fowl. *Journal of Experimental Zoology*, 292 580-586. p.
126. **Palasz, A.T. and Mapletoft, R.J.** (1996): Cryopreservation of mammalian embryos and oocytes: recent advances. *Biotechnology Advances*, 14 127-149. p.
127. **Parkes, A.S. and Smith, A.U.** (1954): Storage of testicular tissue at very low temperatures. *British Medical Journal*, 1 315-316. p.
128. **Parks, J.E., Willard, R.H., Hardaswick, V.** (1986): Cryopreservation of peregrine falcon semen and post-thaw dialysis to remove glycerol. *Raptor Research*, 20 15-20. p.
129. **Parks, J.E. and Graham, J.K.** (1992): Effects of cryopreservation procedures on sperm membranes. *Theriogenology*, 38 209-222. p.
130. **Parrot, D.M.V.** (1959): Orthotopic ovarian grafts in the golden hamster. *Journal of Endocrinology*, 19 126-138. p.
131. **Parrot, D.M.V.** (1960): The fertility of mice with orthotopic ovarian grafts derived from frozen tissue. *Journal of Reproduction and Fertility*, 1 230-241. p.
132. **Penfold, L.M., Harnal, V., Lynch, W., Bird, D., Derrickson, S.R., Wildt, D.E.** (2001): Characterization of Northern pintail (*Anas acuta*) ejaculate and the effect of sperm preservation on fertility. *Reproduction*, 121 267-275. p.
133. **Petitte, J.N.** (2006): Avian germplasm preservation: embryonic stem cells or primordial germ cell. *Poultry Science*, 85 237-242. p.
134. **Péczely, P.** (2013): Madár szaporodásbiológia. *Agroinform Kiadó, Budapest*, 35-133. p.
135. **Phillips, J.J., Bramwell, R.K., Graham, J.K.** (1996): Cryopreservation of rooster sperm using methyl cellulose. *Poultry Science*, 75 915-923. p.
136. **Poels, J., Van Langendonck, A., Dehoux, J.P., Donnez, J., Wyns, C.** (2012): Vitrification of non-human primate immature testicular tissue allows maintenance of proliferating spermatogonial cells after xenografting to recipient mice. *Theriogenology*, 77 1008-1013. p.
137. **Polge, C., Smith, A.U., Parkes, A.S.** (1949): Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. *Nature*, 164 666. p.
138. **Polge, C.** (1951): Functional survival of fowl spermatozoa after freezing at -70°C . *Nature*, 167 949-950. p.
139. **Pukazhenti, B., Comizzoli, P., Travis, A.J., Wildt, D.E.** (2006): Applications of emerging technologies to the study and conservation of threatened and endangered species. *Reproduction, Fertility and Development*, 18 77-90. p.
140. **Rall, W.F.** (1987): Factors affecting the survival of mouse embryos cryopreserved by vitrification. *Cryobiology*, 24 387-402. p.

141. **Reedy, S.E., Leibo, S.P., Clark, M.E., Etches, R.J.** (1995): Beyond Freezing Semen. In: *Bakst, M.R. and Wishart G.J. (Eds.): Proceedings First Symposium on the Artificial Insemination in Poultry. Poultry Science Association, Savoy, Illinois, USA.* 251-261. p.
142. **Saint Jalme, M., Lecoq, R., Seigneurin, F., Blesbois, E., Plouzeau, E.** (2003): Cryopreservation of semen from endangered pheasants: the first step towards a cryobank for endangered avian species. *Theriogenology*, 59 875-888. p.
143. **Sakhatsky, N.I., Andreyev, V.I., Artemenko, A.B.** (1995): Technology of goose sperm low temperature conservation. *Proc. 10th European Symposium on Waterfowl. 26-31 March 1995. Halle, Germany.* 283-285. p.
144. **Santiago-Moreno, J., Castaño, C., Toledano-Díaz, A., Coloma, M.A., López-Sebastián, A., Prieto, M.T., Campo, J.L.** (2011): Semen cryopreservation for the creation of a Spanish poultry breeds cryobank: Optimization of freezing rate and equilibration time. *Poultry Science*, 90 2047-2053. p.
145. **Santos, R.R., Tharasanit, T., Van Haeften, T., Figueiredo, J.R., Silva, J.R.V., Van den Hurk, R.** (2007): Vitrification of goat preantral follicles enclosed in ovarian tissue by using conventional and solid-surface vitrification methods. *Cell Tissue Research*, 327 167-176. p.
146. **Sasaki, K., Tatsumi, T., Tsutsui, M., Niinomi, T., Imai, T., Naito, M., Tajima, A., Nishi, Y.** (2010): A Method for Cryopreserving Semen from Yakido Roosters using N-Methylacetamide as a Cryoprotective Agent. *Journal of Poultry Science*, 47 297-301. p.
147. **Schlatt, S., Kim, S.S., Doshen, R.** (2002): Spermatogenesis and steroidogenesis in mouse, hamster and monkey testicular tissue after cryopreservation and heterotropic grafting to castrated hosts. *Reproduction*, 124 339-346. p.
148. **Schramm, G.P. und Hübner, R.** (1988): Einfluss differenzierter Kryoprotektiva und Gefrierverfahren auf die reproduktive Leistung von langzeitgelagertem Putersperma. *Monatshefte für Veterinärmedizin*, 43 426-427. p.
149. **Schramm, G.P. und Hübner, R.** (1989): Konservierung von Geflügelsperma. *Archiv Tierzucht*, 32 51-61. p.
150. **Schulz, M., Muñoz, M., Risopatrón, M.J., Sánchez, R.** (2006): Cryopreservation of human spermatozoa by vitrification. *International Journal of Morphology*, 24 31. p.
151. **Seigneurin, F. and Blesbois, E.** (1995): Effects of the freezing rate on viability and fertility of frozen-thawed fowl spermatozoa. *Theriogenology*, 43 1351-1358. p.
152. **Seigneurin, F. and Blesbois, E.** (2006): The first method of cryopreservation of guinea fowl semen. *Journées de la Recherche Avicole*, 23 1-2. p.

153. **Seigneurin, F., Grasseau, I., Chapuis, H., Blesbois, E.** (2013): An efficient method of guinea fowl sperm cryopreservation. *Poultry Science*, 92 2988-2996. p.
154. **Sevoian, M.** (1971): Transmission of Type II (Marek's) leukosis with semen from infected roosters. *Poultry Science*, 50 1530-1532. p.
155. **Sexton, T.J.** (1976): Studies on the fertility of frozen fowl semen. *8th International Congress on Animal Reproduction and Artificial Insemination, 12-16 July, 1976. Cracow, Poland.* 1079-1082. p.
156. **Sexton, T.J. and Gee, G.F.** (1978): Comparative Study on the Cryogenic Preservation of Semen from the Sandhill Crane and the Domestic fowl. *Symposia of the Zoological Society of London*, 43 89-95. p.
157. **Sexton, T.J.** (1980): Optimal freezing rate for cooling chicken semen from +5°C to -196°C. *Poultry Science*, 59 2765-2770. p.
158. **Sexton, T.J.** (1981): Development of a commercial method for freezing turkey semen. *Poultry Science*, 60 1567-1572. p.
159. **Shaffner, C.S., Henderson, E.W., Card, C.G.** (1941): Viability of spermatozoa of the chicken under various environmental conditions. *Poultry Science*, 20 259-265. p.
160. **Shaffner, C.S.** (1942): Longevity of fowl spermatozoa in frozen condition. *Science*, 96 337. p.
161. **Shaffner C.S.** (1964): Observations on freezing chicken semen. *5th Global Conference on Animal Reproduction and Artificial Insemination. 6-13 Sept 1964. Trento, Italy.* 3 426-429. p.
162. **Shinohara, T., Inoue, K., Ogonuki, N., Kanatsu-Shinohara, M., Miki, H.** (2002): Birth of offspring following transplantation of cryopreserved immature testicular pieces and *in vitro* microinsemination. *Human Reproduction*, 17 3039-3045. p.
163. **Silber, S.J.** (2012): Ovary cryopreservation and transplantation for fertility preservation. *Molecular Human Reproduction*, 18 59-67. p.
164. **Siudzińska, A. and Łukaszewicz, E.** (2008): The effect of breed on freezability of semen of fancy fowl. *Animal Science Papers and Reports*, 26 331-340. p.
165. **Sloviter, H.** (1951): Recovery of human red blood cells after freezing. *Lancet*, 1 823-824. p.
166. **Song, Y. and Silversides, F.G.** (2006): The technique of orthotopic ovarian transplantation in the chicken. *Poultry Science*, 85 1104-1106. p.
167. **Song, Y. and Silversides, F.G.** (2007a): Heterotopic transplantation of the testes in newly hatched chickens and subsequent production of offspring via intramaginal insemination. *Biology of Reproduction*, 76 598-603. p.

168. **Song, Y. and Silversides, F.G.** (2007b): Offspring produced from orthotopic transplantation of chicken ovaries. *Poultry Science*, 86 107-111. p.
169. **Song, Y., Cheng, K.M., Robertson, M.C., Silversides, F.G.** (2012): Production of donor-derived offspring after ovarian transplantation between Muscovy (*Cairina moschata*) and Pekin (*Anas platyrhynchos*) ducks. *Poultry Science*, 91 197-200. p.
170. **Sontakke, S.D., Umapathy, G., Sivaram, V., Kholkute, S.D., Shivaji, S.** (2004): Semen characteristics, cryopreservation, and successful artificial insemination in the Blue rock pigeon (*Columba livia*). *Theriogenology*, 62 139-153. p.
171. **Sood, S., Malecki, I.A., Tawang, A., Martin, G.B.** (2012): Survival of emu (*Dromaius novaehollandiae*) sperm preserved at subzero temperatures and different cryoprotectant concentrations. *Theriogenology*, 78 1557-1569. p.
172. **Steel, M.G. and Wishart, G.J.** (1996): The effect of removing surface-associated proteins from viable chicken spermatoa on sperm function in vivo and in vitro. *Animal Reproduction Science*, 45 139-147. p.
173. **Sugimoto, M., Maeda, S., Manabe, N., Miyamoto, H.** (2000): Development of infantile rat ovaries autotransplanted after cryopreservation by vitrification. *Theriogenology*, 53 1093-1103. p.
174. **Surai, P.F. and Wishart, G.J.** (1996): Poultry artificial insemination technology in the countries of the former USSR. *World's Poultry Science Journal*, 52 27-43. p.
175. **Szalay, I.** (2002): Régi magyar baromfifajták (Old Hungarian Poultry). *Mezőgazda Kiadó, Budapest*. 50-51. p.
176. **Szalay, I.** (2004): Alternatív baromfitenyésztés és -tartás. *Mezőgazda Kiadó, Budapest*. 18-19. p.
177. **Sztein, J., Sweet, H., Farley, J., Mobraaten, I.** (1998): Cryopreservation and orthotopic transplantation of mouse ovaries: new approach in gamete banking. *Biology of Reproduction*, 58 1071-1074. p.
178. **Tai, J.J., Chen, J.C., Wu, K.C., Wang, S.D., Tai, C.** (2001): Cryopreservation of gander semen. *British Poultry Science*, 42 384-388. p.
179. **Tajima, A., Graham, E.F., Shoffner, R.N., Otis, J.S., Hawkins, D.M.** (1990): Research Note: Cryopreservation of Semen from Unique Lines of Chicken Germ Plasm. *Poultry Science*, 69 999-1002. p.
180. **Tajima, A.** (2002): Production of germ-line chimeras and their application in domestic chicken. *Avian and Poultry Biology Reviews*, 13 15-30. p.

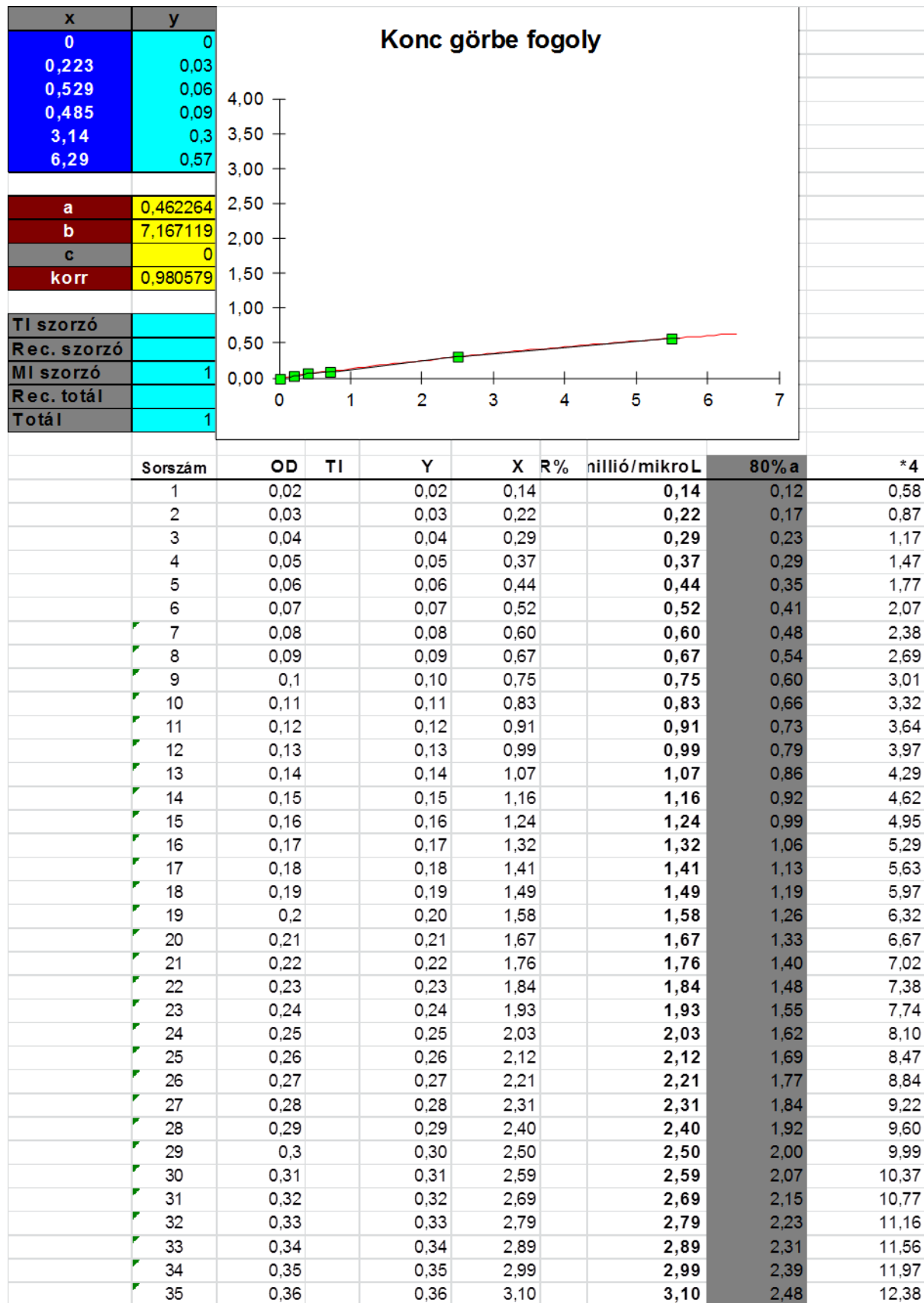
181. **Taylor, M.J., Ying, C., Song, C., Brockband, K.G.M.** (2004): Vitrification in Tissue Preservation. New Developments. In: *Benson, E.; Fuller, B.; Lane, N. (eds.): Life in the Frozen State, Taylor and Francis Group, London (GBR).* 12 371-392. p.
182. **Terada, T., Ashizawa, K., Maeda, T., Tsutsumi, Y.** (1989): Efficacy of trehalose in cryopreservation of chicken spermatozoa. *Japanese Journal of Animal Reproduction*, 35 20-25. p.
183. **Tereshchenko, A.V., Artemenko, A.B., Sakhatsky, N.I.** (1992): Cryopreservation of chicken semen. *Proc. of the 12th International Congress of Animal Reproduction, 23-27 August 1992. Hague, The Netherlands*, 1602-1604. p.
184. **Tisdell, C.** (2003): Socioeconomic causes of loss of animal genetic diversity: analysis and assessment. *Ecological Economics*, 45 365-376. p.
185. **Travers, A., Milazzo, J.P., Perdrix, A., Metton, C., Bironneau, A., Macé, B., Rives, N.** (2011): Assesment of freezing procedures for rat immature testicular tissue. *Theriogenology*, 76 981-990. p.
186. **Trefil, P., Bakst, M.R., Yan, H., Hejnar, J., Kalina, J., Mucksová, J.** (2010): Restoration of spermatogenesis after transplantation of c-Kit positive testicular cells in the fowl. *Theriogenology*, 74 1670-1676. p.
187. **Tselutin, K., Narubina, L., Mavrodina, D., Tur, B.** (1995): Cryopreservation of poultry semen. *British Poultry Science*, 36 805-811. p.
188. **Tselutin, K., Seigneurin, F., Blesbois, E.** (1999): Comparison of cryoprotectants and methods of cryopreservation of fowl spermatozoa. *Poultry Science*, 78 586-590. p.
189. **Vajta, G.** (2000): Vitrification of the oocytes and embryos of domestic animals. *Animal Reproduction Science*, 60-61 357-364. p.
190. **Vajta, G. and Nagy, Zs.P.** (2006): Are programmable freezers still needed in the embryo laboratory? *Reproductive BioMedicine Online*, 12 779-796. p.
191. **Van Krey, H.P., Ogasawara, F.X., Lorenz, F.W.** (1966): Distribution of spermatozoa in the oviduct and fertility in domestic birds. *Journal of Reproduction and Fertility*, 11 257-262. p.
192. **Van Voorst, A. and Leestra, F.R.** (1995): Fertility rate of daily collected and cryopreserved fowl semen. *Poultry Science*, 74 136-140. p.
193. **Váradi, É., Végi, B., Liptói, K., Barna, J.** (2013): Methods for Cryopreservation of Guinea Fowl Sperm. *Plos One*, 8 (4) e62759.
194. **Végi, B., Varga, Á., Szóke, Zs., Liptói, K., Várkonyi, E., Lennert, L., Barna, J.** (2005): Relationship between insemination of frozen sperm and early embryonic death in domestic fowl. *The 2nd Combined Workshop of Fundamental Physiology of the*

- European Working Group of Physiology and Perinatal Development in Poultry, September 23 – 25, Berlin, Germany.* 55. p.
195. **Voronina, M.S., Komarova, V.V., Moskalenko, L.I.** (1986): Effect of different diluents and cock sperm cryopreservation methods on results of artificial insemination (Russian). *Sbornik Nauchnikh Trudov VNIRGJ, Leningrad*, 71-79. p.
196. **Wang, X., Chen, H., Yin, H., Kim, S.S., Tan, S.L., Gosden, R.G.** (2002): Fertility after intact ovary transplantation (brief communication). *Nature*, 415 385. p.
197. **Wang, Y., Xiao, Z., Li, L., Fan, W., Li, S.W.** (2008): Novel needle immersed vitrification: a practical and convenient method with potential advantages in mouse and human ovarian tissue cryopreservation. *Human Reproduction*, 23 2256-2265. p.
198. **Watanabe, M. and Terada, T.** (1980): Fertility of frozen fowl semen stored for long term (9years). *Journal of the Faculty of Applied Biological Sciences (Hiroshima University)*, 19 155-159. p.
199. **Williamson, R.G., Etches, R.J., Reinhart, B.S., MacPherson, J.W.** (1981): The effect of cooling rate before freezing and the temperature of the semen upon addition of DMSO on the fertilizing capacity of chicken semen stored at -196°C. *Reproduction Nutrition Development*, 21 1033-1042. p.
200. **Wishart, G.J.** (1985): Quantitation of the fertilising ability of fresh compared with frozen and thawed fowl spermatozoa. *British Poultry Science*, 26 375-380. p.
201. **Wishart, G.J. and Palmer, F.H.** (1986): The effect of cryopreservation at -196°C on the viability of fowl and turkey spermatozoa assessed *in vitro*. *Animal Reproduction Science*, 10 317-324. p.
202. **Wishart, G.J.** (1995): Cryopreservation of Avian Spermatozoa. In: *Day, J.G. and McLellan, M.R. (eds): Cryopreservation and Freeze-Drying Protocols. Methods in Molecular Biology. Humana Press Inc., Totowa, NJ, USA.* 38 167-177. p.
203. **Wishart, G.J. and Hartley, P.S.** (1998): Cryoconservation of avian species. *Cryoletters*, 1 39-46. p.
204. **Wishart, G.J.** (1999): Avian Sperm: Egg Interaction: Mechanisms and Practical Application for Analysis of Fertility. *Proc. of the International Congress on Bird Reproduction, 22-24 September 1999, Tours, France*, 215-222. p.
205. **Wishart, G.J.** (2000): Szóbeli közlés.
206. **Woelders, H., Zuidberg, C.A., Hiemstra, S.J.** (2006): Animal genetic resources conservation in The Netherlands and Europe: poultry perspective. *Poultry Science*, 85 216-222. p.

207. **Wolfné Táskai, E.** (2000): A madarak szaporodásbiológiai folyamatai. *In: Husvéth F. (Szerk.): A gazdasági állatok élettana az anatómia alapjaival. Mezőgazda Kiadó. 592-607. p.*
208. **Woods, E.J., Benson, J.D., Agca, Y., Critser, J.K.** (2004): Fundamental cryobiology of reproductive cells and tissues. *Cryobiology*, 48 146-156. p.
209. **Zaniboni, L., Cassinelli, C., Mangiagalli, M.G., Gliozzi, T.M., Cerolini, S.** (2014): Pellet cryopreservation for chicken semen: Effects of sperm working concentration, cryoprotectant concentration and equilibration time during *in vitro* processing. *Theriogenology*, 8 251-258. p.
210. **Zavos, P.M. and Graham, E.F.** (1983): Effects of various degrees of supercooling and nucleation temperatures on fertility of frozen turkey semen. *Cryobiology*, 20 553-559. p.

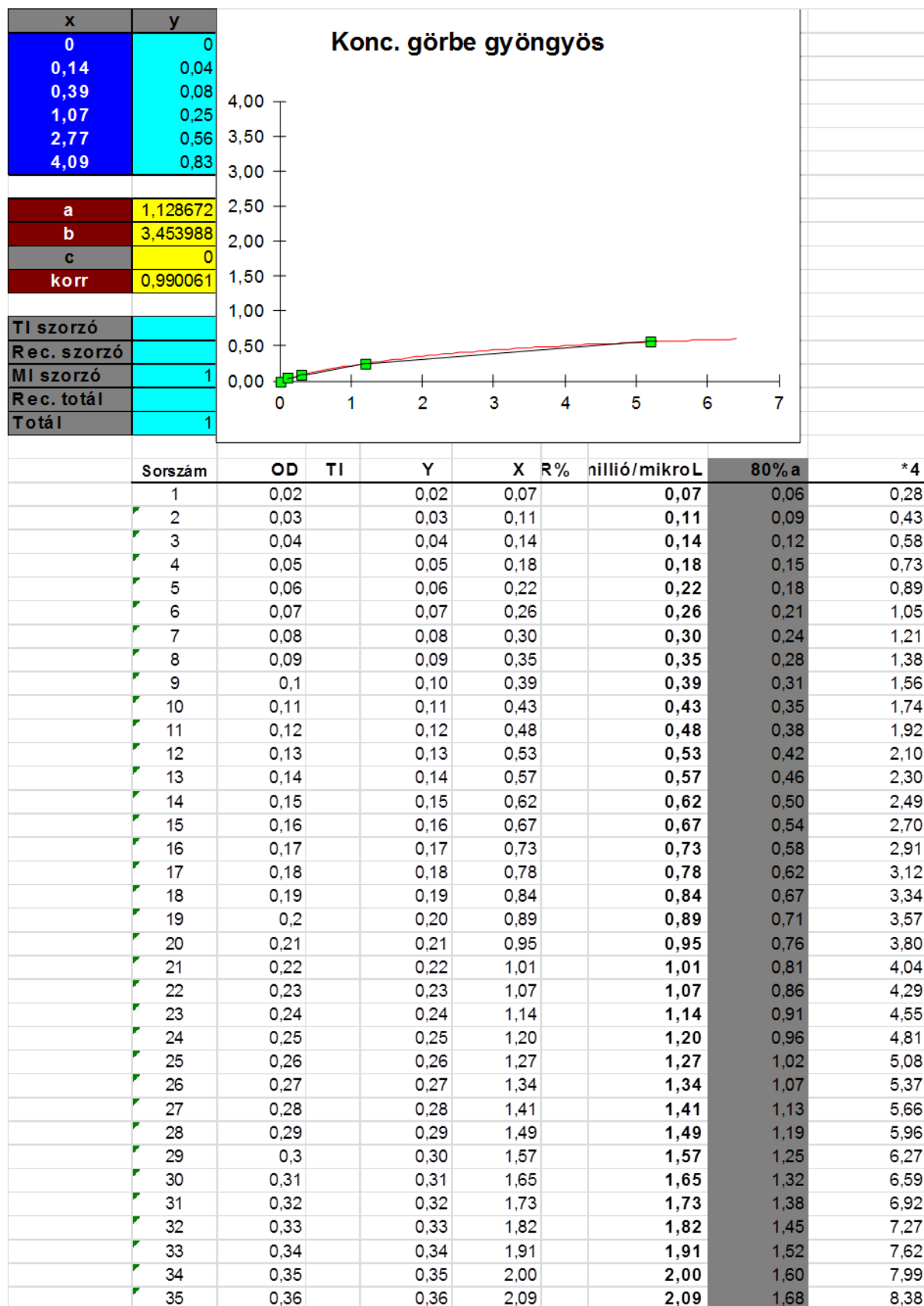
M2/a. Spermium-koncentrációs görbék - fogolyszínű magyar kakasok

1. táblázat. A fogolyszínű magyar kakasok spermium-koncentrációs görbéje



M2/b. Spermium-koncentrációs görbék - magyar parlagi gyöngytyúk kakasok

2. táblázat. A magyar parlagi gyöngytyúk kakasok spermium-koncentrációs görbéje



M3. Az ondómélyhűtési eljárásokban alkalmazott ondóhígítók összetétele

3. táblázat: Lake-féle kriooldat összetétele

| Anyagok | g/100 ml |
|--|----------|
| Glicerol (C ₃ H ₈ O ₃) | 13,64 |
| Nátrium-L-glutamát-1hidrát (C ₅ H ₈ NO ₄ Na·H ₂ O) | 1,92 |
| Magnézium-acetát-4hidrát (CH ₃ COO) ₂ Mg·4H ₂ O | 0,08 |
| Kálium-acetát (CH ₃ COOK) | 0,5 |
| Polyvinyl pirrolidin (C ₆ H ₉ NO) _n | 0,3 |
| D(+)-Glükóz-1hidrát (C ₆ H ₁₂ O ₆ ·H ₂ O) | 0,8 |

4. táblázat: Felolvasztó hígító összetétele

| Anyagok | g/100 ml |
|---|----------|
| Nátrium-L-glutamát-1hidrát (C ₅ H ₈ NO ₄ Na·H ₂ O) | 1,92 |
| Magnézium-acetát-4hidrát (CH ₃ COO) ₂ Mg·4H ₂ O | 0,08 |
| tri-Kálium-citrát-1hidrát (C ₆ H ₅ K ₃ O ₇ ·H ₂ O) | 0,13 |
| Nátrium-acetát (C ₂ H ₃ NaO ₂) | 0,51 |
| D(+)-Glükóz-1hidrát (C ₆ H ₁₂ O ₆ ·H ₂ O) | 0,6 |

5. táblázat: Tselutin-féle hígító összetétele

| Anyagok | g/100 ml |
|--|----------|
| D(-)Fruktóz (C ₆ H ₁₂ O ₆) | 0,8 |
| Protamin-szulfát | 0,032 |
| Kálium-acetát (CH ₃ COOK) | 0,5 |
| Nátrium-L-glutamát-1hidrát (C ₅ H ₈ NO ₄ Na·H ₂ O) | 1,92 |
| Polyvinyl pirrolidin (C ₆ H ₉ NO) _n | 0,3 |

6. táblázat: Lake-féle hígító összetétele

| Anyagok | g/100 ml |
|--|----------|
| Nátrium-L-glutamát-1hidrát (C ₅ H ₈ NO ₄ Na·H ₂ O) | 1,92 |
| Magnézium-acetát-4hidrát (CH ₃ COO) ₂ Mg·4H ₂ O | 0,07 |
| Kálium-acetát (CH ₃ COOK) | 0,5 |
| Polyvinyl pirrolidin (C ₆ H ₉ NO) _n | 0,3 |
| D(-)Fruktóz (C ₆ H ₁₂ O ₆) | 0,8 |

7. táblázat: Łukaszewicz-féle hígító

| Anyagok | g/100 ml |
|---|----------|
| Kálium-citrát (C ₆ H ₅ O ₇ K ₃ ·H ₂ O) | 0,14 |
| Nátrium-glutamát-1hidrát (C ₅ H ₈ NO ₄ Na·H ₂ O) | 1,4 |
| Nátrium-dihidrogén-foszfát (NaH ₂ PO ₄) | 0,21 |
| di-Nátrium-hidrogén-foszfát-2hidrát (Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O) | 0,98 |
| D(+)-Glükóz-1hidrát (C ₆ H ₁₂ O ₆ ·H ₂ O) | 0,7 |
| D(-)Fruktóz (C ₆ H ₁₂ O ₆) | 0,2 |
| myo-Inosit (C ₆ H ₁₂ O ₆) | 0,7 |
| Protamin szulfát | 0,02 |
| Polyvinyl pirrolidin (C ₆ H ₉ NO) _n | 0,1 |

M4. In vitro vizsgálatok adatai - házityúk-faj

8. táblázat: Az ondóminősítések adatai házityúk-fajban

| Vizsgálatok sorszáma | Mélyhűtési módszer | Friss (mélyhűtés előtti) ondóminőség | | | Felolvasztás utáni ondóminőség | | | Minta db | Túlélés (%) Én%-ra |
|----------------------|---------------------|--------------------------------------|--------|-----------|--------------------------------|--------|-----------|----------|-----------------------|
| | | Én(%) | Abn(%) | Elhalt(%) | Én(%) | Abn(%) | Elhalt(%) | | |
| 1 | Lassú, programozott | 90,5 | 5,5 | 4 | 11,5 | 4,5 | 84 | 19 | 12,71 |
| | Pellet-módszer | 86 | 7,5 | 6,5 | 6 | 1,5 | 92,5 | 6 | 6,98 |
| 2 | Lassú, programozott | 84 | 5,5 | 10,5 | 3 | 0,5 | 96,5 | 14 | 3,57 |
| | Pellet-módszer | 85,5 | 8,5 | 6 | 8 | 8,5 | 83,5 | 7 | 9,36 |
| 3 | Lassú, programozott | 91 | 6 | 3 | 6 | 2,5 | 91,5 | 17 | 6,59 |
| | Pellet-módszer | 90,5 | 4,5 | 5 | 16,5 | 3,5 | 80 | 7 | 18,23 |
| 4 | Pellet-módszer | 87,5 | 7,5 | 5 | 10,5 | 2 | 87,5 | 7 | 12,00 |
| | Pellet-módszer | 89,5 | 5,5 | 5 | 7 | 2,5 | 90,5 | 7 | 7,82 |
| | Lassú, programozott | 85,5 | 8,5 | 6 | 7,5 | 7,5 | 85 | 19 | 8,77 |
| 5 | Lassú, programozott | 84 | 7,5 | 8,5 | 10,5 | 3,5 | 86 | 19 | 12,50 |
| 6 | Lassú, programozott | 85,5 | 7,5 | 7 | 13 | 4,5 | 82,5 | 20 | 15,20 |
| | Pellet-módszer | 87,5 | 8 | 4,5 | 15 | 7 | 78 | 6 | 17,14 |
| 7 | Lassú, programozott | 89,5 | 7 | 3,5 | 7,5 | 6 | 86,5 | 20 | 8,38 |
| | Pellet-módszer | 88 | 8 | 4 | 6,5 | 1 | 92,5 | 6 | 7,39 |
| 8 | Lassú, programozott | 87 | 8,5 | 4,5 | 5,5 | 8,5 | 86 | 22 | 6,32 |
| | Pellet-módszer | 86 | 11 | 3 | 15 | 2,5 | 82,5 | 6 | 17,44 |

Én(%): Élő, normális morfológiájú spermiumok aránya.

Abn(%): Élő, rendellenes spermiumok aránya.

Elhalt(%): Elhalt spermiumok aránya.

M5/a. *In vitro* vizsgálatok adatai (ondóminősítés) - gyöngytyúkfej

9. táblázat: Az ondóminősítések adatai gyöngytyúkfejben

| Vizsgálatok sorszáma | Mélyhűtési módszer | CP | Friss (mélyhűtés előtti) ondóminőség | | | Felolvasztás utáni ondóminőség | | | Minta | Túlélés (%) | | |
|----------------------|---------------------|---------------------|--------------------------------------|---------|------------|--------------------------------|---------|------------|-------|-------------|-------|------|
| | | | Én (%) | Abn (%) | Elhalt (%) | Én (%) | Abn (%) | Elhalt (%) | db | Én%-ra | | |
| 1 | Lassú, programozott | 10% EG | 73,5 | 17 | 9,5 | 22,8 | 26,4 | 50,9 | 7 | 31,00 | | |
| | | 6% DMF | 78,5 | 16,5 | 5 | 10,0 | 15,5 | 74,5 | 12 | 12,74 | | |
| 2 | | 10% EG | 72,4 | 13,6 | 14 | 19,0 | 22,7 | 58,3 | 10 | 26,24 | | |
| | | 6% DMF | 72,4 | 13,6 | 14 | 9,5 | 19,9 | 70,6 | 10 | 13,12 | | |
| 3 | | 10% EG | 85,8 | 2 | 12,2 | 19,3 | 24,5 | 56,2 | 10 | 22,49 | | |
| | | 6% DMF | 85,8 | 2 | 12,2 | 8,3 | 18,1 | 73,6 | 10 | 9,67 | | |
| 4 | | Gyors, programozott | 10% EG | 72 | 19 | 9 | 10,6 | 17,6 | 71,9 | 10 | 14,72 | |
| | | | 6% DMF | 72 | 19 | 9 | 12,0 | 11,2 | 76,9 | 10 | 16,60 | |
| 5 | | | 10% EG | 66 | 21 | 13 | 10,3 | 14,3 | 75,4 | 10 | 15,61 | |
| | | | 6% DMF | 66 | 21 | 13 | 11,3 | 10,8 | 77,9 | 10 | 17,12 | |
| 6 | | | 10% EG | 64,5 | 19 | 16,5 | 5,1 | 16 | 78,9 | 10 | 7,91 | |
| | | | 6% DMF | 64,5 | 19 | 16,5 | 9,6 | 11,7 | 78,7 | 10 | 14,88 | |
| 7 | | | 10% EG | 79 | 10,5 | 10,5 | 6,7 | 17,3 | 76,0 | 6 | 8,44 | |
| | | | 6% DMF | 79 | 10,5 | 10,5 | 9,3 | 9,7 | 81,0 | 6 | 11,81 | |
| 8 | | | Nitrogéngőzös | 10% EG | 75,5 | 18,5 | 6 | 0,4 | 0,2 | 99,4 | 10 | 0,53 |
| | | | | 6% DMF | 75,5 | 18,5 | 6 | 0,7 | 1,1 | 98,2 | 10 | 0,93 |
| 9 | 10% EG | | | 68,5 | 22,5 | 9 | 9,4 | 14,0 | 76,6 | 6 | 13,76 | |
| | 6% DMF | | | 68,5 | 22,5 | 9 | 8,5 | 10,7 | 80,8 | 6 | 12,41 | |
| 10 | 10% EG | | | 76,5 | 15 | 8,5 | 6,1 | 18,4 | 75,5 | 10 | 7,97 | |
| | 6% DMF | | | 76,5 | 15 | 8,5 | 6,6 | 9,3 | 84,1 | 10 | 8,63 | |
| 11 | 10% EG | | | 73,5 | 16,5 | 10 | 8,1 | 12,7 | 79,2 | 10 | 11,02 | |
| | 6% DMF | | | 73,5 | 16,5 | 10 | 10,2 | 13,9 | 75,9 | 10 | 13,88 | |
| 12 | Pellet-módszer | 6% DMA | | 76,5 | 12,5 | 11 | 21 | 11 | 68 | 4 | 27,45 | |
| 13 | Lassú, programozott | 10% EG | | 74 | 18 | 8 | 12,3 | 19,7 | 68 | 10 | 16,62 | |
| | | 6% DMF | | 74 | 18 | 8 | 7,2 | 20,4 | 72,4 | 10 | 9,73 | |
| 14 | Pellet-módszer | 6% DMA | | 76 | 16 | 8 | 20,3 | 8,3 | 71,3 | 3 | 26,75 | |
| 15 | | 6% DMA | | 71,5 | 18,5 | 10 | 19,3 | 11,3 | 69,3 | 3 | 27,04 | |
| 16 | | 6% DMA | | 74 | 7,5 | 18,5 | 26,6 | 8,6 | 64,8 | 2 | 35,95 | |

CP: Krioprotektáns fajtája.

Én(%): Élő, normális morfológiájú spermiumok aránya.

Abn(%): Élő, rendellenes spermiumok aránya.

Elhalt(%): Elhalt spermiumok aránya.

M5/b. In vitro vizsgálatok adatai (rendellenességek vizsgálata) - gyöngytyúk faj

10. táblázat: Élő, rendellenes sejtek adatai az előfordulásuk helye szerint

| Vizsgálat sorszáma | Mélyhűtési módszer | CP | Élő, rendellenes sejtek az előfordulásuk helye szerint | | | | Össz Abn(%) | | |
|--------------------|---------------------|---------------------|--|--------|------|--------|-------------|------|-----|
| | | | Akr% | Fej% | Kdb% | Farok% | | | |
| 1 | Lassú, programozott | 10% EG | 0,1 | 0,3 | 22,7 | 3,6 | 26,6 | | |
| | | 6% DMF | 0,7 | 1,0 | 11,0 | 2,8 | 15,4 | | |
| 2 | | 10% EG | 0,0 | 1,4 | 17,4 | 4,3 | 23,0 | | |
| | | 6% DMF | 0,8 | 0,8 | 14,7 | 3,6 | 19,8 | | |
| 3 | | 10% EG | 0,0 | 1,6 | 19,7 | 3,2 | 24,5 | | |
| | | 6% DMF | 0,6 | 0,8 | 14,4 | 2,3 | 18,1 | | |
| 4 | | Gyors, programozott | 10% EG | 0,1 | 0,5 | 13,0 | 2,6 | 16,1 | |
| | | | 6% DMF | 1,2 | 0,6 | 8,1 | 1,5 | 11,5 | |
| 5 | | | 10% EG | 0,0 | 0,7 | 12,0 | 1,6 | 14,3 | |
| | | | 6% DMF | 0,1 | 0,1 | 8,1 | 2,4 | 10,7 | |
| 6 | | | 10% EG | 0,1 | 0,2 | 13,8 | 1,9 | 16 | |
| | | | 6% DMF | 0,7 | 0,7 | 7,7 | 2,6 | 11,7 | |
| 7 | | | 10% EG | 0,0 | 0,2 | 15,0 | 1,8 | 17,0 | |
| | | | 6% DMF | 0,3 | 0,5 | 6,0 | 2,8 | 9,7 | |
| 8 | | | Nitrogéngőzös | 10% EG | 0,0 | 0,0 | 0,1 | 0,1 | 0,2 |
| | | | | 6% DMF | 0,0 | 0,0 | 1,1 | 0,0 | 1,1 |
| 9 | 10% EG | | | 0,0 | 0,7 | 10,9 | 2,4 | 14,0 | |
| | 6% DMF | | | 0,5 | 1,0 | 6,2 | 3,0 | 10,7 | |
| 10 | 10% EG | | | 0,0 | 0,9 | 13,5 | 4,0 | 18,4 | |
| | 6% DMF | | | 0,6 | 0,6 | 5,0 | 3,2 | 9,4 | |
| 11 | 10% EG | | | 0,0 | 0,4 | 10,6 | 1,7 | 12,7 | |
| | 6% DMF | | | 1,3 | 1,0 | 7,2 | 4,4 | 13,9 | |
| 12 | Pellet-módszer | 6% DMA | | 1,0 | 2,3 | 6,5 | 1,3 | 11 | |
| 13 | Lassú, programozott | 10% EG | | 0,0 | 1,4 | 14,7 | 3,8 | 19,9 | |
| | | 6% DMF | | 0,6 | 0,9 | 14,7 | 4,2 | 20,4 | |
| 14 | Pellet-módszer | 6%DMA | | 0,0 | 2,0 | 6,0 | 0,3 | 8,3 | |
| 15 | | 6%DMA | | 0,7 | 1,3 | 9,0 | 0,0 | 11,0 | |
| 16 | | 6%DMA | | 0,9 | 1,7 | 6,1 | 0,0 | 8,7 | |

CP: Krioprotektáns fajtája.

Akr%: Akroszómán található rendellenesség.

Fej%: A spermium feji részén található rendellenesség.

Kdb%. A spermium középarabján található rendellenesség.

Farok%: A spermium farki részén található rendellenesség.

Össz Abn(%): Az összes élő, rendellenes spermiumok aránya.

M6. In vitro vizsgálatok adatai - házilúd-faj

11. táblázat: Különböző ozmo-és krioprotektánsok hatásának vizsgálata

| Vizsgálatok sorszáma | Mélyhűtési módszer | Protokoll | Friss (mélyhűtés előtti) ondóminőség | | | Felolvasztás utáni ondóminőség | | | Minta db | Túlélés (%) Én%-ra |
|----------------------|--------------------|-----------|--------------------------------------|---------|------------|--------------------------------|---------|------------|----------|-----------------------|
| | | | Én (%) | Abn (%) | Elhalt (%) | Én (%) | Abn (%) | Elhalt (%) | | |
| 1 | Programozott | 1 | 85,5 | 3,5 | 11 | 39,8 | 11,4 | 48,8 | 4 | 46,59 |
| | | 2 | 85,5 | 3,5 | 11 | 41,9 | 11,1 | 47,1 | 5 | 48,95 |
| | | 3 | 85,5 | 3,5 | 11 | 42,1 | 14,6 | 43,3 | 5 | 49,22 |
| | | 4 | 85,5 | 3,5 | 11 | 40,4 | 14,1 | 45,5 | 6 | 47,27 |
| | Nitrogéngőzös | 1 | 85,5 | 3,5 | 11 | 38,1 | 12,3 | 49,6 | 6 | 44,54 |
| | | 2 | 85,5 | 3,5 | 11 | 33,3 | 11,3 | 55,4 | 6 | 38,99 |
| | | 3 | 85,5 | 3,5 | 11 | 30,8 | 8,9 | 60,3 | 6 | 35,96 |
| | | 4 | 85,5 | 3,5 | 11 | 38,3 | 11 | 50,7 | 5 | 44,80 |
| 2 | Programozott | 1 | 84,5 | 10,5 | 5 | 34,3 | 14,1 | 51,6 | 7 | 40,61 |
| | | 2 | 84,5 | 10,5 | 5 | 39,1 | 15,5 | 45,4 | 8 | 46,23 |
| | | 3 | 84,5 | 10,5 | 5 | 37,7 | 16,9 | 45,4 | 8 | 44,63 |
| | | 4 | 84,5 | 10,5 | 5 | 40,8 | 13,8 | 45,4 | 8 | 48,22 |
| | Nitrogéngőzös | 1 | 84,5 | 10,5 | 5 | 37,7 | 18,8 | 43,5 | 8 | 44,60 |
| | | 2 | 84,5 | 10,5 | 5 | 39,7 | 17,4 | 42,9 | 8 | 46,97 |
| | | 3 | 84,5 | 10,5 | 5 | 33,4 | 16,0 | 50,6 | 7 | 39,51 |
| | | 4 | 84,5 | 10,5 | 5 | 36,3 | 16,3 | 47,4 | 8 | 42,97 |
| 3 | Programozott | 1 | 75 | 15,5 | 9,5 | 33,4 | 20,4 | 46,2 | 7 | 44,58 |
| | | 2 | 75 | 15,5 | 9,5 | 38,1 | 20,8 | 41,1 | 8 | 50,83 |
| | | 3 | 75 | 15,5 | 9,5 | 38,8 | 20,4 | 40,8 | 7 | 51,71 |
| | | 4 | 75 | 15,5 | 9,5 | 39,1 | 24,1 | 36,8 | 6 | 52,17 |
| | Nitrogéngőzös | 1 | 75 | 15,5 | 9,5 | 36,2 | 20,4 | 43,4 | 7 | 48,27 |
| | | 2 | 75 | 15,5 | 9,5 | 37,7 | 16,5 | 45,8 | 7 | 50,29 |
| | | 3 | 75 | 15,5 | 9,5 | 37,4 | 19 | 43,6 | 7 | 49,87 |
| | | 4 | 75 | 15,5 | 9,5 | 37,1 | 17,2 | 45,6 | 7 | 49,52 |

12. táblázat: Mélyhűtött ondóminták betárolása mesterséges termékenyítéshez

| Vizsgálatok sorszáma | Mélyhűtési módszer | Friss (mélyhűtés előtti) ondóminőség | | | Felolvasztás utáni ondóminőség | | | Minta db | Túlélés (%) Én%-ra |
|----------------------|---------------------------------|--------------------------------------|---------|------------|--------------------------------|---------|------------|----------|-----------------------|
| | | Én (%) | Abn (%) | Elhalt (%) | Én (%) | Abn (%) | Elhalt (%) | | |
| 1 | Nitrogéngőzös 1-es protokoll | 85,5 | 11,5 | 3 | 16,7 | 7,5 | 75,8 | 26 | 19,52 |
| 2 | | 73 | 27 | 0 | 33,1 | 16,1 | 50,8 | 46 | 45,38 |
| 3 | | 85,5 | 12,5 | 2 | 31,6 | 13,5 | 54,9 | 40 | 36,99 |
| 4 | | 74 | 21 | 5 | 35,0 | 21,8 | 43,3 | 36 | 47,30 |

Én(%): Élő, normális morfológiájú spermiumok aránya.

Abn(%): Élő, rendellenes spermiumok aránya.

Elhalt(%): Elhalt spermiumok aránya.

9. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Ezúton szeretném megragadni az alkalmat, hogy köszönetet mondjak mindazoknak, akik munkám elkészítésében segítségemre voltak és doktori tanulmányaim alatt szakmailag és emberileg is folyamatosan támogattak.

Mindenekelőtt hálával tartozom témavezetőmnek **Dr. Barna Juditnak**, hogy kísérleteimhez minden szükséges feltételt biztosított és a munkám során felmerülő problémák megoldásában mindig segítségemre sietett. Köszönöm szépen, hogy - igazi mentorként - szakmailag és barátilag is mindig számíthattam rá.

Hálásan köszönöm **Dr. Péczely Péter** segítségét, aki egyetemi éveim alatt bevezetett a madár szaporodásbiológia rejtelseibe és később is bármikor számíthattam értékes szaktudására és segítségére. Emellett köszönöm a Szent István Egyetem egykori Szaporodásbiológiai Laboratóriuma Kedves Dolgozóinak - különösen **Dr. Ferencziné Dr. Szőke Zsuzsannának**-, hogy annak idején bekapcsolódhattam az ott folyó tudományos munkába.

Kiemelten szeretném megköszönni a **HÁGK Genetikai és Szaporodásbiológiai Kutatócsoport** Minden Kedves Munkatársának a sok segítséget és a folyamatos biztatást.

Nagyon köszönöm **Dr. Végi Barbara** sokoldalú segítségét, aki türelmesen vezetett be a Szaporodásbiológiai Laboratóriumban folyó munka rejtelseibe, valamint folyamatosan példát mutatott számomra elhivatottságból bebizonyítva, hogy „nincs lehetetlen, csak tehetetlen”.

Szeretném megköszönni **Dr. Liptói Krisztinának**, hogy kitartóan agitált doktori tanulmányaim elkezdésére és a kutatásaim során felmerülő kérdések tisztázásában mindig segítségemre volt. Köszönöm szépen a korai ivarszerv-szövetek mélyhűtésével kapcsolatos kísérleteimben és az embrióelhalások vizsgálatánál nyújtott segítségét.

Köszönettel tartozom **Drobnayk Árpád** PhD hallgatónak, hogy készségesen segítségemre volt kísérleteim gyakorlati kivitelezése során.

Köszönet illeti **Dr. Gál Jánost** a Szent István Egyetem (ÁOTK) Egzotikusállat és Vadegészségügyi Tanszékének vezetőjét a szövettani vizsgálatok elkészítésében és szakmai értékelésében nyújtott segítségéért.

Köszönöm szépen **Kiss Csabának**, a Kisbéri Lúdtenyésztő Kft. ügyvezetőjének hasznos szakmai tanácsait és az ondómélyhűtési kísérleteim során nyújtott segítségét.

Végül szeretném megköszönni **Családomnak** és **Barátaimnak**, hogy mindvégig mellettem álltak és türelmesen támogatták munkámat.