



MAGYAR AGRÁR- ÉS ÉLETTUDOMÁNYI EGYETEM
ÁLLATTENYÉSZTÉSI TUDOMÁNYOK INTÉZET
SZENT ISTVÁN CAMPUS

**ŐSHONOS MAGYAR KAKASOK
ONDÓMÉLYHŰTÉSÉNEK VIZSGÁLATA
ANTIOXIDÁNSOK KIEGÉSZÍTÉSÉVEL**

TDK-DOLGOZAT

Készítette: **Bányász Ádám**
CBS5LO
Osztatlan agrármérnök szak
Nappali tagozat

Konzulensek:

Dr. Végi Barbara
tudományos főmunkatárs, Nemzeti Biodiverzitás- és Génmegőrzési Központ
Haszonállat-génmegőrzési Intézet, Génmegőrzés- tudományi és
kisállattenyésztési Osztály

Dr. Egerszegi István
egyetemi docens, MATE, Állattenyésztés-tudományi Intézet, Állattenyésztés-
technológiai és Állatjóléti Tanszék, Szent István Campus,

**Gödöllő
2022.**

1.BEVEZETÉS

Az emberi népesség-növekedésnek, mely az 1950-es éveket követően, az előtt soha nem tapasztalt mértékben ugrott meg egyik feltétele volt, hogy kialakult egy olyan konvencionális állattenyésztés, mely képes az addigiakhoz képest kisebb hozzáadott értékkel, nagyobb mennyiségű és egész évben elérhető állati terméket előállítani (Oldenbroek, 2007).

A fogyasztói szükségletet kielégítve hozták létre a modern fajtákat és hibrideket, melyek a magas termelési képességüknek köszönhetően az egész világon elterjedtek, ilyen tekintetben ezeket az állományokat nevezhetjük invazív fajtáknak is (Hoffmann, 2010).

Az intenzív fajták, hibridek mellett az őshonos állományok háttérbe szorultak, veszélyeztetetté váltak, esetleg kihaltak, mellyel a genetikai sokféleség került veszélybe (Delany, 2000). Őshonos háziállat fajtáink fenntartása nem csak a biológiai sokféleség fenntartása miatt fontos, hanem folyamatosan változó környezetünkben idővel előtérbe kerülhetnek olyan tényezők, melyekhez az őshonos, régebbi fajták jobban alkalmazkodtak, így potenciális keresztezési partnerként is tekinthetünk ezen fajtákra (Szalay 2017).

A házi tyúk faj (*Gallus gallus domesticus*) esetében is a háziasítás és a faj elterjedése során kialakult extenzív fajták adták az intenzív fajták, hibridek kialakulásának alapját (Tixier-Boichard et al. 2011). A fent említett folyamatok világszerte jellemzőek a mai házi tyúktartásra is, mind a tojástermelő, mind a hústermelő állományokban.

A világ házi tyúkpiacát, ha vizsgáljuk, el kell különítenünk a húshasznú, elsősorban broiler állományokat, illetve a tojástermelőket. A világ broiler állományának csaknem egésze, mindössze 2 fajtára vezethető vissza, ezek a cornish és a plymouth (Hoffmann 2005). A tojóállomány szinte csupán a leghorn, a rhode island és plymouth fajtától származnak (Benk 2019).

A FAO Domestic Animal Diversity Information System (DAD-IS) nevű adatbázisában szereplő, Európában és a kaukázusi régióban tartott házi tyúk fajták (melyekről van információ) csupán 22%-a nem veszélyeztetett, 64%-uk veszélyeztetett, míg 14%-uk már kihalt 2022-re (<http> 1).

Annak érdekében, hogy a meglévő, egyedi genetikai potenciállal rendelkező házi- és haszonállatfajták, így az őshonos házi tyúk fajták továbbra is fennmaradhassanak szükség van intézményes formában megvalósított génmegőrzési programokra, melyeknek génbankjai mára már világszerte őrzik a különböző fajtákat. Magyarországon az őshonos baromfifajták *ex situ in vivo*, illetve *ex situ in vitro* génmegőrzését a Nemzeti Biodiverzitás- és Génmegőrző Központban végzik. Jelen vannak a különböző fajták élő elit állományai, melyeket egymástól

elzárva külön-külön istállókban helyeznek el, az eredeti „természetes környezetükből” kiemelve (*ex situ in vivo*) (Szalay 2017). Az *ex situ in vitro* génbankban folyékony nitrogénben mélyhűtött formában tárolják az állomány ondómintáit. Ezen *in vitro* tartósítási mód a legelterjedtebb a világon. Ennek egyik oka, hogy madarak esetében a petesejt megalecitális volta, jelen ismereteink szerint nem teszi lehetővé a mélyhűtést és felolvasztást követő megtermékenyítést, ezért kifejlett ivarsejtek közül csak a hímivarsejtek jöhetnek számításba. Viszont így, mivel a madarak esetében a heterogametikus ivar, ezért a nőivari (♀:ZW, ♂:ZZ) W kromoszóma tartósításának módja jelentős lehetne (Blesbois & Labbé 2003). Ezzel kapcsolatban már sikeresen mélyhűtöttek majd olvasztottak fel jelentős károsodás nélkül, illetve transzplantáltak, baromfi embrionális sejteket és petefészek-szöveteket is, ám ezen eljárások még kevésbé kidolgozottak, és nehezen alkalmazhatóak jelenleg a gyakorlatban (Song & Silversides 2006, Tajima, 2002, Liu et. al. 2013).

Ebből adódóan jelenleg az ondómélyhűtés a leghatékonyabb az őshonos baromfi fajták örökítő anyagának hosszútávú tárolására a gyakorlatban. A FAO ajánlása a házi tyúk ondómélyhűtésére 2 módszert javasol. Az eddigi kutatások igen változatos eredményeket produkáltak a különböző ondómélyhűtési protokollok alkalmazása kapcsán a baromfi fajok, sőt fajták esetében is (Végi et. al. 2017a).

Annak érdekében tehát, hogy a különböző fajok és fajták specifikus igényeinek a lehető legjobban megfelelő, és a rendelkezésre álló technológiai háttérrel maximálisan kihasználó ondómélyhűtési protokollt hozzák létre, elengedhetetlen a folyamatos kutatás és fejlesztés.

1.1 Célkitűzés

A kutatásom célja, hogy az őshonos magyar kakasok ondómélyhűtési eredményeinek fejlesztése érdekében, vizsgáljam a mélyhűtés során alkalmazott ondóhígítóban, a spermiumok oxidatív stresszel szembeni védelmét feltehetően javító antioxidáns-kiegészítés hatásait a mélyhűtés után felolvasztott spermiumok minőségére. A kutatásban használt antioxidánsok az L-karnitin és a szericin voltak.

2. SZAKIRODALMI ÁTTEKINTÉS

2.1. Az őshonos magyar tyúk

Vizsgálatainkat a fogoly színű magyar tyúk kakasain végeztük, ezért szükségesnek találom ezen fajta, illetve a magyar fajtákat bemutatni.

Az őshonos magyar tyúkfajták két csoportra oszthatók, ezek a magyar tyúk fajták és az erdélyi kopasz nyakú tyúkfajták. A két csoport közti elsőszámú különbség az erdélyiekre jellemző teljesen csupasz nyak, illetve szárnyuk valamivel hosszabb és hegyesebb, mellük pedig kerekesebb, valamint törzsük és tojásuk is nagyobb, mint a magyar tyúkfajtáké. Egyező tulajdonságuk a kettős hasznú jelleg, ennek megfelelően a tyúkok 2,0-2,3, a kakasok pedig 2,5-3,0 kg tömegűek. Tojástermelésük elérheti az évi 140-150 db-ot. A hazai klimatikus és ökológiai környezethez legjobban alkalmazkodott fajták, ennek megfelelően élelemkereső képességük kiváló. Erősen jelentkezik esetükben a „röghatás”, Vérmérsékletük élénk. Csontozatuk vékony, de erős. Húsminőségük kiváló, bár szerény húsformákat mutatnak (Szalay, 2015).

A magyar tyúk külső tulajdonságaira általánosan jellemző, hogy középhosszú törzsük, kissé hengeres. A tyúkok egyenes, hosszú, míg a kakasok rövidebb ívelt háttal rendelkeznek. Mellük telt, domború és széles. Jellemzőjük a magasan tűzött szárny, a középhosszú lábak, melyek többnyire sárgák, az igen fejlett tojóhas, a túlfejlett faroktollak és a testhez simuló tollazat. Kis fejjel, domború koponyával, rövid és erős csőrrel, illetve élénk szemmel rendelkeznek. Tarójuk középnagy egyszerű fűrésztaraj, mely hátra nyúlik és felálló, tyúkok esetében gyakorta megdőlt. Áll- és füllebenyűk élénkvörös és kerekded (Szalay, 2015).

Mivel a magyar őshonos tyúkfajtákra az idők során csupán kevés nemesítő munka hatott, ezért ma, mint géntartalékokként tekinthetünk rájuk, és ezen tulajdonságuk nemzetközi szempontból is értékelhető (Bodó, 2001).

A ma ismert hét őshonos magyar tyúkfajtáról, így a sárga, fehér, kendermagos és fogolyszínű, illetve a fekete, fehér és kendermagos erdélyi kopasz nyakú tyúkfajtáról elmondható, hogy igen heterogén származású fajtacsoportról van szó (Szalay, 2015).

A fogolyszínű magyar tyúk a többi fajtaéhoz képest kevésbé egységes állományú, mivel mentett kis létszámú állományát csak az 1990-es években sikerült fellelni Gyöngyöspatán, és addig az eredetinek mondható parlagi fajtára, sok külföldi fajta is hatással volt. Így addigra a fajta majdnem teljesen eltűnt. A fajtamentésnek köszönhetően 2004-ben elismert fajta lett, melynek elit állományát Gödöllőn és Debrecenben is fenntartják ([http 2](http://2))

A fajta jellegzetessége a fogolyszínű tollazat, melynek megfelelően a kakas fejtollazata narancsvörös, nyereg- és nyaktollazata aranysárga, mell, comb és hastájékain a tollak feketék. Fekete faroktollai zölden zománczottak. A tyúk alapszíne barna, evezőtollai feketék vagy barnák, illetve barna tollai rajzoltosak, mely a nyak, mell és szárnytollak esetében kifejezettebb. Csőr- és lábszíne fehér, hússzínű vagy sárga (csőr lehet barnán pigmentált). Szeme narancsvörös. Taréja, arca, áll- és füllebenye vérpiros (1.ábra) (Szalay, 2015).



1. ábra: Fogolyszínű magyar tyúk (kakas)
(Fotó:NBGK-HGI)

2.2. A hímivarú madarak szaporodásbiológiai sajátosságai

A madarak szaporodásbiológiai sajátosságai számos tulajdonságban térnek el az emlősökétől, ezért érdemes az, ondómélyhűtési és -vizsgálati protokollokat is befolyásoló különbségeket bemutatni.

2.2.1. A hím ivari készülék jellegzetességei

A madarak esetében a hímivarban is számos, a spermavételt, ondómélyhűtést és mesterséges termékenyítést is befolyásoló sajátosság mutatkozik, melyeket érdemesnek tartok bemutatni.

A madarakban a herék nem a hasüregen kívül a *scrotum*-ban találhatók, hanem a hasüregben, a vesék cranialis polusa felett az abdominális légzsákokban kapnak helyet (Péczeley, 2013), így az emlősökre jellemző, heréket és mellékheréket érintő levegő általi hőszabályzó hatás nem érvényesül. A madarak heréi és mellékheréi testhőmérsékleten ($\sim 40^{\circ}\text{C}$) működnek (Williams, 1958).

A madarak mellékheréinek nincs akkora szerepe a spermiumok tárolásában, mint az emlősöknél, mert ezen funkciót itt az ondóvezető tölti be. (Clulow & Jones 1982). A spermiumok a madaraknál csupán néhány órát töltenek a mellékherében (japán fűrj: 2 óra), míg emlősöknél ez az idő 1-2 hét, ez alatt emlősöknél megtörténik a mellékherei maturáció (Cornwall & Hann 1995), ami alatt a spermiumok ostorozó mozgása fejlődik ki (Morton et. al. 1978), illetve a plazmamembrán lipid- és fehérje-összetételében is változások történnek (Jones 1998). Ezen érési folyamat elengedhetetlen a spermiumok termékenyítőképességének kialakulásához. Ehhez képest ezek a folyamatok a madarakban nem ennyire nélkülözhetetlenek, hiszen a közvetlenül a herékből vett spermiumokkal is képesek voltak, az infundibulumba történő inszeminálással termékeny tojást előállítani (Howarth 1971). Viszont madaraknál is kimutatták, hogy a mellékherékben a spermiumok motilitása erősen megnövekedett, japán fűrjekkel végzett vizsgálatban (Nixon et.al. 2013).

A madarak hím ivari traktusában nem alakultak ki az olyan, emlősökre jellemző járulékos mirigyek, mint a prosztata, a Cowper-mirigy vagy az ondóhólyag, melyek váladéka adná az ondó plazma frakcióját, vagyis az ondófolyadékot, helyettük az ivari készülék bizonyos részeninek mirigyes hámja termeli azt (Fujihara, 1992).

Az elsődleges ondófolyadékot a herében, a herecsatornácskák rete testisbe történő csatlakozása előtti szakaszán található módosult Sertoli-sejtek termelik. A következő váladéktermelő elemek a rete testis-ben találhatók, ahol jelentős a hámsejtek spermiumtörmeléket és más anyagokat érintő fagocitózisa. Tovább haladva az ondó a mellékherébe kerül, itt a beáramlott folyadék 86%-os visszaszívása történik. A mellékhere ductus epididymis részében újabb, fehérje típusú váladék adódik az ondóhoz, mely a spermiumokra tapadva azok sejtköpenyét (cell-coat) adják. Az ondóvezetőben a termelt fehérjeváladék hatására tovább nő a sejtköpeny, illetve itt fontos szénhidrát-kiválasztás is történik. Az egyes fajokban előfordulnak más szekréciók is, ám ezek a házi tyúk esetében nem relevánsak (Aire, 1982, Kwon, et.al. 1997, Péczely, 2013)

A madarak párzószerve (*phallus*-a) is alapvetően különbözik az emlősök péniszétől, ugyanis a legtöbb madár faj nem rendelkezik párzószervvel. Azon fajokat, melyeknek van phallusa két csoportba sorolhatjuk. Az egyik csoport a kiölthető párzószervűek (*phallus protrudens*), ide tartoznak a baromfifajok közül a házi kacs, a pézsmaréce és a lúd. A másik csoport pedig a nem kiölthető párzószervűek (*phallus non protrudens*), melyhez tartoznak a tyúkkalkatúak, így a házityúk, a fűrj, a pulyka vagy a gyöngytyúk. Mindkét párzószervtípus esetében az ondó nőivari kloákán keresztüli vaginába történő juttatását a párzószerv oly módon

segíti, hogy az ondó annak felületén egy, az erekció során kialakult árkon, esetleg csövön keresztül folyik ki. Ezen sajátosságnak igen nagy jelentősége van a spermavétel során (Péczeley 2013).

2.2.2. A madárspermiumok jellegzetességei

Nem csak az genitális szervek, hanem a spermiumok sajátosságaiban is adódnak különbségek a madarakat és az emlősöket szembe állítva, melyeket célszerű jelen dolgozat kapcsán kiemelni.

A madárspermiumok felépítése leginkább a hüllőkére hasonlít, viszont az emlősökétől sem tér el nagy mértékben. Emellett az egyes madárfajok spermiumszerkezetét összehasonlítva igen nagy variabilitást tapasztalhatunk (Péczeley, 2013)

Különbség van az emlős és madár spermiumok alakja között, ugyanis az emlősöknél megszokott ovális spermiumfejhez képest a madarak hímivarsejtjei fonalas alakúak, melynek gyakorlati jelentősége az ondóvizsgálat kapcsán mutatkozik meg, ugyanis az eredetileg emlősspermiumokra kalibrált számítógépes elemzőszoftverek (CASA – Computer-assisted sperm analysis) az ovális spermiumfejet képesek nagy pontossággal követni, míg a madárspermiumok vékony fejét nehezen (Santiago-Moreno et al. 2016).

A madárspermiumok sajátossága, hogy az emlősökre jellemző, a fejet és a középdarabot összekötő nyaki rész vagy csatló nem jelenik meg, így a két rész egyszerűbben kapcsolódik egymáshoz (Grigg és Hodge, 1949).

A madár- és emlősspermiumok között különbség van azok mélyhűtéssel és felolvasztással szembeni toleranciájuk kapcsán. A madárspermiumok ugyanis érzékenyebben ilyen téren az emlősökéhez viszonyítva, Ennek elsőszámú oka, hogy a madarak spermamembránjában nagyobb arányban vannak jelen többszörösen telítetlen zsírsavak (Polyunsaturated fatty acid – PUFA) (Darin-Bennett & White, 1977; Santiago-Moreno et al., 2012). Ezen PUFA-k jobban kitettek a reaktív oxigén gyökök (ROS) káros hatásainak, hajlamosak a peroxidációra, mely a spermiumsejtek pusztulását okozza (Fujihara & Howarth, 1978; Jones, & Mann, 1973; Kim, & Parthasarathy, 1998). A mélyhűtés és felolvasztás során az ondó káros ROS-koncentrációja pedig megnő. (Lásd.: Antioxidáns védelmi rendszer) (Surai et al. 1998a).

Spermiogenezis kapcsán is meg kell említeni néhány, a két osztály közötti különbséget. A spermiogenezis, mely madaraknál az összefüggő és egymásba torkolló herecsatornácskák hámjában helikális lefutású ciklusok formájában történik (Péczeley, 2013). A spermio-

morfogenezis emlősökre jellemző 14 stádiuma helyett 10 stádiumban valósul meg a spermiumtermelés (Aire, 2007). Ezen ciklusok hossza emlősökben kb. 11, míg japán fűrj esetében 2,7 nap-ig tartanak (Lin & Jones, 1990, Lin et. al. 1990). Egy spermium, spermatogoniumból történő létrejötte madarak esetében gyorsabb, mint emlősöknél, gyöngytyúk, kakas és néma kacsá esetében kb. 14, míg bikáknál 37 napig tart (Noirault et. al., 2006).

2.3. Génmegőrzés

Mivel a bemutatni kívánt kutatás célja tulajdonképpen az őshonos magyar kakasok fajtavédelmének egy lehetséges fejlesztése, ezért érdemesnek tartom a génmegőrzést röviden bemutatni.

A génmegőrzés, fogalom szerint a genetikai erőforrások védelmét jelenti. Ez alapján a génmegőrzés alanya lehet bármely olyan élőlény vagy élőlénycsoport, melynek fennmaradása különböző körülmények okán kérdéses, viszont valamilyen értéke miatt fenntartása szükséges. Ilyen ok lehet ökológiai, gazdasági vagy egyszerűen a biológiai sokszínűség fenntartása (http 3).

Állattenyésztési szempontból vizsgálva a génmegőrzés elsősorban a különböző haszonállat fajták, illetve azok fajtaváltozatainak megőrzését jelenti, a következőkben ezen aspektusból szeretném a génmegőrzést bemutatni.

Az ENSZ 1992-es Rio de Janeiro-i Környezet és Fejlődés Konferenciáján megfogalmazták, hogy a háziállatok is a védendő biológiai értékek közé sorolandók, melynek azért volt nagy jelentősége, mivel addig globálisan nem tekintették a biológiai sokféleséget növelő tényezőnek az emberi tevékenység során létrejött fajtákat, sem a kultúrnövények, sem pedig a háziállatok vonatkozásában. Ez és az ehhez hasonló konferenciák és a biodiverzitás fenntartását segítő nemzetközi szervezetek létrejötte következtében az 1980-as évektől új korszak kezdődött az állattenyésztési géntartalékok védelmében, amikor a háziállatfajták fenntartása globális kérdéssé vált. Ez a korszak váltotta fel az egy-egy ország (pl.: Magyarország, Franciaország, Anglia) által saját fajtaikat fenntartó korszakot, illetve az azt megelőző, az egy-egy állattartó az őseitől örökölt fajta védelmének időszakát (Bodó 1991).

Jelenleg világszerte a fajták védelme többnyire a FAO iránymutatásai szerint zajlik (FAO, 2022).

Világviszonylatban hazánk úttörőnek számított az őshonos haszonállataink védelmében, ugyanis a magyar állami gazdaságok már az 1960-as évek során elindították a magyar szürke

szarvasmarha, a racka juh és a mangalica védelmét (Bodó, 2001). Ezt követően 1973-ban a Mezőgazdasági és Élelmezésügyi Minisztérium határozatot hozott, mely előírta a génbankok megszervezését, mellyel kívánták csökkenteni a meglévő fajták génvesztését (Szalay 2017). Ezen génbankok jogutódjaiban végzik ma is az őshonos fajtáink genetikai védelmét. Jelenleg a feladatok koordinálását a Nemzeti Biodiverzitás- és Génmegőrzési Központ (NBGK) látja el, mely az őshonos 35 állatfajta mellett a hazai növényi génbank létesítéséért is felel ([http 3](http://3)).

A génmegőrzés kapcsán meg kell említeni, annak lehetséges formáit. Ez szerint a háziállat-génállomány megőrzése történhet *in situ* és *ex situ* formában. Az *in situ* génmegőrzés során az állatokat eredeti, a fajta kialakulásában szerepet játszó, vagy ahhoz nagyon hasonló tartási és tenyésztési környezetben tartják, erre példa jelenleg a nemzeti parkjainkban, elsősorban a táj fenntartása okán tartott legelő haszonállatok. Az *ex situ* formában történő génmegőrzés során pedig az állatok állományát az eredeti környezetükből kiemelve tartják fenn. Ezen génmegőrzési forma tipikus, intézményesült változatai a génbankok. A génbankok ezen felül lehetnek *in vivo*-k és *in vitro*-k. Az *in vivo* génbankok esetében a megőrizni kívánt génállományt élő formában tartják fenn. Ezen forma különösen a kis létszámú, veszélyeztetett populációk esetében fontos, főként, ha nincs lehetőség szaporítóanyag hosszútávú tárolására, illetve, mert az ilyen kis létszámú állományok jobban ki vannak téve a genetikai sodródás káros hatásainak, ezért lényeges az ilyen populációk tudatos tenyésztése és növelése (Szalay & Koppány, 2017, Woelders et. al., 2006). Az *in vitro* génbanki génmegőrzés során a szaporító anyagot laboratóriumokban mélyhűtve tárolják. Ebben az esetben a tartósított anyag legtöbbször ondóminta, de lehet embrió, pete- illetve testisejt is. Az *in vitro* tartósítás előnye, hogy a minták a tárolás során számottevő károsodás nélkül képesek a génállomány hosszútávú megőrzésére, miközben nem veszélyeztetik környezeti viszonyok vagy betegségek. Ennek természetes előfeltétele, hogy a tárolás során végig fennmaradjanak a tárolási körülmények, és a felolvasztást követően képesek legyenek a minták az eredeti funkciójukat betölteni. Ehhez folyamatos ráfordításra, figyelemre, technológiai háttérre és speciális szaktudásra van szükség (Bodó, 2019). Az *in vitro* tartósítás gyakorlati előnye még, hogy kisebb helyigényű, ehhez kapcsolódóan szállítása többnyire egyszerűbb az élőállat-szállításhoz viszonyítva, illetve az *in vivo* állományok takarmányozási és technológiai fenntartása is drágább (bár ezt a piaci helyzet jelentősen befolyásolja) (Bodó, 2001). Célravezető és a minőséget hosszútávon biztosító génmegőrzés a különböző módszerek integrált használatával érhető el (Szalay, 2017).

Az NBGK gödöllői telephelyén ez említett integrált génmegőrzési szemléletnek megfelelően tartják fenn a 14 baromfifajtánk génbanki állományát. Az *in vitro* génbank állománya 2014-óta folyamatosan bővül és fejlesztés alatt áll, helyet adva ezzel a

Szaporodásbiológiai Laboratórium újabb és újabb kutatásainak, többek között jelen kutatásnak is (<http> 3).

2.4. Az ondómélyhűtés alapjai

Nem lehet pontosan megmondani, hogy az emberiség, a történelem során mikor kezdte el használni az alacsony hőmérsékletet a különböző biológiai anyagok tartósítására. Viszont az tudható, hogy már Kr.e. 2000 környékén Mezopotámiában az ételeket hűtőházakban tartósították, tehát mesterségesen, külön technológiát alkalmazva őrizték meg a számukra fontos biológiai anyagok minőségét (Forbes, 1958).

Az ondó, mint biológiai anyag első feljegyzett mélyhűtése 1776-ban történt, ekkor Lazzaro Spallanzani lóspermiumokat hűtött hó segítségével, és megfigyelte, hogy azok hideg hatására mozdulatlaná, majd felolvadás után újból mozgékonyá válnak. Ezen empirikus ismeretnek akkor gyakorlati hasznát nem vették (Spallanzani, 1776). Molisch 1897-ben kimutatta, hogy a sejtek krioprezerválás során bekövetkező pusztulását az azokban képződő jégkristályok okozzák.

Az 1900-as évek első felében előtérbe kerülő mesterséges termékenyítéssel kapcsolatos kutatások során szükségessé vált az ondó minták tárolása, annak érdekében, hogy az ondóvétel szükségszerűen ne közvetlenül az inszeminálást megelőzően történhessen, ezért szükség volt a spermiumok minőségét megőrző anyagokra és módszerekre. Az első ilyen spermavédő anyag a tojássárgája volt, mellyel 150-180 órán át 10 °C-on képesek voltak a bikaspermiumok termékenyítő képességét megőrizni (Phillips & Lardy, 1940). Az első sikeres ondómélyhűtést és felolvasztást Luyet & Hodap végezte (1938) vitrifikációs technikával békaondóval, folyékony levegő hűtőközeggel szacharózos tápoldattal. 1940-ben kelt ki az első mélyhűtött majd felolvasztott ondóval termékenyített házi tyúk csibe Shaffner és munkatársai (1941) kísérlete során. A használt ondót fruktóz oldatban -6°C-on 30 másodpercig tartották fagyott állapotban. Emellett képesek voltak -76°C-on történő mélyhűtéssel 52 nap után életképes spermiumot kimutatni, bár az már termékenységet nem eredményezett.

Nagy áttörést jelentett Polge és munkatársai (1949) kutatása, melyben a glicerol krioprezerválás közbeni spermavédő tulajdonságát fedezték fel, így a glicerol lett az első nagy hatékonysággal alkalmazható krioprotektáns.

Annak érdekében, hogy egy magas biológiai értékű apaállatnak minél több utódja születhessen, szükséges a korlátozott mennyiségű ondóját hígítani, mindezt olyan ondóhígító oldattal lehet elérni, mely segíti az ondóminőségét fenntartani. Ehhez fajonként különböző

receptúrákat hoztak létre, de az oldat anyagainak funkciója mindegyikben azonos. Az oldatok oldószere minden esetben víz, mely fiziológiás koncentrációban tartalmaz sót, puffereket a szükséges kémhatás kialakításához, tápanyagot (cukrokat) a spermiumok energiaszükségletének kielégítésére, kiegészülhet a mikróbák szaporodását gátló anyaggal, illetve krioprotektánsal (Donoghue & Wishart, 2000).

Mivel a sejtek működésének legfőbb komponense a víz, ezért annak fázisváltozása és az az által okozott biológiai funkciók megváltozása elemi jelentőségű a sejtek mélyhűtése és felolvasztása alatt, ezért ezen probléma adja a cryobiológia tudományának tárgyát (Liu et. al., 2013).

A mélyhűtés és a felolvasztás alatt a sejtek jelentős stressznek vannak kitéve, melynek komplex hátterét pontosan ma sem ismerjük (Pegg, 2014), viszont alapvető tényezői az ozmotikus nyomáskülönbség-változások, a változó membránfeszülés és membrántulajdonságok, a keletkező intra- és extracelluláris jégkristályok okozta közvetett és közvetlen károsítások, a sejt és a sejtszervecskék membránkárosodása, valamint a használt kryoprotektánsok esetleges negatív hatásai (Parks & Graham, 1992).

A mélyhűtés során megkülönböztetünk kritikus hőmérsékleti tartományokat, az első ilyen a $+15$ és -5°C közötti tartomány, mely a membránokat alkotó lipidek és koleszterin fázisváltozását és ezáltal membrán-szerkezetváltozását okozza, mely folyamatok esetenként irreverzibilisek, ezáltal károsak. Ezt nevezik a sejteket érő hideg sokknak (Leibo et. al., 1996, Ricker et. al., 2006). Ez a tartomány igen tág, hiszen ezen anyagok különböző hőmérsékleteken dermednek meg, illetve az egyes fajok membránösszetétele is változó (Mandal et. al., 2014).

A következő és egyben legmeghatározóbb a 0 - -45°C közötti tartomány, ilyenkor keletkeznek nagyobb tömegben a membránokat károsító és hiperozmotikus nyomásviszonyokat kialakító intracelluláris, káros jégkristályok (Buss, 1993). A jégkristályképződés még ez alatt, -80°C -ig folytatódik a sejten belüli és azon kívüli térben, ám ezennek káros hatása elenyésző. -150°C alatti hőmérsékleten a spermiumok károsodása a legalacsonyabb, a folyékony nitrogénben, -196°C -on tartott ondó minőségromlása minimális (Vajta & Nagy, 2006).

A felolvasztás során a spermiumok ugyancsak károsodhatnak, ugyanis a fagyáspont körüli hőmérsékleten „újrakristályosodás” történhet, új, nagyobb méretű jégkristályok képződhetnek (Fahy & Wowk, 2014).

2.4.1. Krioprotektánsok

Azokat az anyagokat, melyek képesek a membránszerkezetet oly módon megváltoztatni, hogy azok permeabilitása növekedjen, és ez által a sejtek víztartalma lecsökkenjen, így gátolva a káros jégkristályképződést, krioprotektánsoknak (CPA) nevezzük (Barbas & Mascarenhas, 2009). Ilyen az elsőként felfedezett glicerol is. A krioprotektánsokat két csoportba sorolhatjuk az alapján, hogy hol fejtik ki hatásukat, ezek a penetráló vagy intracelluláris (PA), és a nem penetráló vagy extracelluláris krioprotektánsok (NPA). A penetrálók kis molekulatömegűeknek (100 dalton alatt) köszönhetően bejutnak a spermiumokba és így dehidratációt és fagyáspontcsökkenést okoznak ott. Ezek közül leggyakrabban használt anyagok a glicerol (Gly), a dimetil-szulfoxid (DMSO), az etilén-glikol (EG), és a propilén-glikol (PG). A nem penetráló krioprotektánsok a sejten kívül okoznak hiperozmotikus nyomást, így a sejtől ugyancsak vízkilépés történik. Leggyakrabban alkalmazott NPA-k a polietilén-glikol (PEG), a polivinil-pirrolidon (PVP), a raffinóz, a szacharóz és a trechalóz. Az egyes krioprotektánsok magasabb koncentrációnál toxikusak a sejtek számára (főként a PA-k), ezért a kedvező sejtvédő tulajdonságuk kihasználása és toxikus hatásuk minimalizálása érdekében különböző keverékeket hoztak létre, emellett az alacsonyabb koncentráció mellett toxikusabb penetráló krioprotektánsokat csupán közvetlenül a hűtést megelőzően fagyponthoz közeli hőmérsékleten adják a mintákhoz (Végi et. al. 2017b, Whaley et. al., 2021). Ezek mellett a kifejezetten citotoxikus CPA-kat (jellemzően a glicerolt) a felolvasztást követően szükséges az ondóból eltávolítani, mely művelet károsítja a spermiumok egy részét (Hammerstedt & Graham, 1992).

2.4.2. Mélyhűtési módszerek

Az ondómélyhűtési módszereket csoportosíthatjuk, a tárolás módja és a hűtés és felmelegítés sebessége alapján (Váradi, 2016).

Az ondómintákat tárolhatók kriocsőben, műszalmában és pelletált formában. A legelterjedtebb ezek közül a műszalmás tárolás, ilyenkor az ondómintákat műanyag (PP, PVC, PETG) töltve tárolják, melyek térfogata madároundó esetében rendszerint 0,25ml (http 5, Woelders, 2021). Kevésbé elterjedt technika a kirocsőves tárolás, ilyenkor az ondót zárható műanyag edénybe töltik, melynek hűtése speciális, programozható mélyhűtő berendezésben, vagy nitrogéngáz felett történik. (Váradi, 2016).

A mélyhűtés sebessége szerint alapvetően két hűtési protokollt különítünk el, a hagyományos (konvencionális) fagyasztást, illetve a vitrifikációs (ultragyors) hűtési eljárást (Li et.al. 2019). A vitrifikációs eljárás alatt az anyagot minimum 2500 (Palasz & Mapletoft, 1996), de akár 700000°C/perc sebességgel hűtik (Isachenko et. al., 2003), melynek következtében a

sejtekben és azokon kívül nem alakulnak ki jégkristályok, mivel nem áll rendelkezésre elég idő a vízmolekuláknak a kristályszerkezet felvételére, így azok amorf módon szilárdulnak meg, „üvegesedés” történik, ebből kifolyólag ilyenkor nem fagyasztásról és felolvasztásról, hanem hűtésről és melegítésről van szó (Bojic et. al. 2021). Ezen eljárás során a sejtek károsításában a felmelegítéskor megjelenő oxmotikus imbalance játszik szerepet (Morris, 2012). A vitrifikációs eljárásokban növelik a minták viszkozitását, illetve az alkalmazott krioprotektánsok koncentrációját, emellett minimumra csökkentik annak mennyiségét, mely eljárás néhány sejtes szövet, vagy egy petesejt esetében egyszerűbb, ám ondónál ez nehézkes (Vajta, 2000). Mivel a nagy koncentrációban alkalmazott krioprotektánsok a felmelegítést követően igen citotoxikus hatásúak, és eltávolításuk igen spermiumkárosító, ezért újabban kísérleteznek krioprotektánsmentes vitrifikációval, Akiyama és munkatársai (2019) „superflash” technikával képesek voltak egér fibroblaszt sejteket sikeresen mélyhűteni, majd visszamelegíteni.

A hagyományos mélyhűtési protokollokat megkülönböztethetjük a hűtés programozhatósága alapján (Woelders, 2021). A programozott hűtési eljárás során az ondómintákat tartalmazó speciális kriocsöveket vagy szalmákat programozható mélyhűtő berendezésben hűtik, így a kritikus intracelluláris jégkristályképződést igyekeznek kiküszöbölni a különböző hűtési sebességek alkalmazásával, ugyanis ilyen viszonylag lassú hűtés esetén az extracelluláris térben képződő nagy méretű jégkristályok miatt hipertónia lép fel, ez miatt a sejtekből a víz kiáramlik, így azokban a jégkristályképződés korlátozottá válik (Amann és Picket, 1987). A technológia legfőbb hátránya a hűtő berendezés magas ára és a rendszer relatíve nehéz kezelhetősége (Vajta & Nagy, 2006).

Nem programozható eljárás a nitrogén gőzös hűtés, ilyenkor az ondóval töltött szalmákat folyékony nitrogén fölött meghatározott magasságban tartják, így a magasság beállításával meghatározható a hűtőközeg (nitrogén gőz) hőmérséklete. A módszer „gyenge pontja” a nitrogéngőzben keltett turbulenciák, és a különböző külső hőmérsékletek okozta hőmérsékletingadozás. Ám erre számos megoldás született, mellyel javítani lehetett a protokoll ismételhetőségét (Woelders, 2021). A módszer előnye a relatív alacsony tökeigény, és a rugalmas és egyszerű használat. Hátránya viszont a folyékony nitrogén okozta magas munkavédelmi kockázat (Creemers et. al., 2011, Váradi, et.al.2019).

Másik nem programozható protokoll a pelletmódszer, mely során 5-50 µL-es hígított ondócseppeket csepegtetnek folyékony nitrogénbe, vagy szárazjég felületére, majd a keletkező pelleteket összegyűjtve tárolják. Az eljárás előnye, a legalacsonyabb eszköz és időigénye, illetve, hogy a hűtőközeg közvetlenül a hűteni kívánt anyaggal, ez esetben az ondómintával találkozik, így a tárolóedény szigetelő, a hűtést lassító hatása nem érvényesül. Hátránya, hogy

a pelletek azonosíthatósága korlátos, emellett a hűtés mértéke csak a csepp méretével szabályozható, viszont extrém kis méretű csepp esetén vitrifikáció történhet. Hátránya még, hogy a folyékony nitrogénben tárolt pelletek térfogata a tárolás során csökken, ami növeli a spermiumpusztulást (Váradi et. al. 2019, Váradi, 2016, Woelders, 2021), illetve itt is jelen van a folyékony nitrogén, mit munkavédelmi kockázat (Creemers et. al., 2011).

A hűtési protokollokat követően mindegyik esetben a spermiumok hosszútávú tárolása folyékony nitrogénben történik. A felmelegítés üteme általánosságban a hűtés ütemével megegyező, azaz gyorsan hűtött ondót gyorsan, míg a lassan hűtöttöket lassan melegítik fel (Végi et.al., 2017b).

Az alkalmazott ondómélyhűtési módszer megválasztását az anyagi és infrastruktúrális lehetőségek ismerete mellett a faj speciális igényeinek megfelelően kell megválasztani. Az említett mélyhűtési módok mindegyike megfelel a baromfik és azon belül a házi tyúk spermiumok *in vitro* tartósítására (Barna et.al., 2008).

2.4.3. Ondómélyhűtési technikák házi tyúk fajban

Az első valóban sikeres ondómélyhűtési protokollt a házi tyúk fajt illetően Lake és Stewart dolgozta ki (1978), akik glicerol krioprotektánszal, lassú hűtési rátát alkalmazva 80%-os termékenységet értek el. A glicerol koncentrációját a kontraceptív hatása miatt a felolvasztott ondóban 2% alá kell csökkenteni, mely eljárás körülményes és spermiumkárosító (Lake, 1968). Ezért később több kutatás is foglalkozott a glicerolt kiváltó, kevésbé citotoxikus krioprotektánsok keresésével, és az azokhoz tartozó protokollok megalkotásával (Végi et al 2017a).

Sexton (1980) 50%-os termékenységet produkált az általa alkalmazott módszerrel, melyben dimetil-szulfoxidot (DMSO) használt kryoprotektánsként. Később több anyagról is bebizonyosodott a krioprotektív hatás kakasspermiumok vonatkozásában, ilyen volt az etilén-glikol (EG) és a dimetil-acetamid (DMA), ezekkel 55-64%-os, illetve a dimetil-formamiddal (DMF) 75-85%-os termékenységet értek el (Hübner & Schramm, 1988, Tereshchenko, et.al. 1992). A programozott mélyhűtési módszerek fejlesztésével az évek alatt sikerült javítani a különböző krioprotektánsok alkalmazása mellett elért eredményeken, így például Van Voorst és Leenstra (1995) DMSO-val 82-90%-os, Ehling és munkatársai (2012) pedig DMF és metil-acetamid (MA) kombinálásával több mint 80%-os termékenységről számoltak be.

Pellet módszerrel Tselutin és munkatársai (1995), DMA használatával 93-94%-os termékenységet értek el, ettől kezdve számos kutatás foglalkozott a pelletmódszer

fejlesztésével, ám a korábban említett előnyei miatt a műszalmában történő tárolás terjedt el a glicerolos mélyhűtés mellett a spermabanki gyakorlatban (Végi, et.al.2017a).

A lassú mélyhűtés mellett az egyszerűbb nitrogéngőzös hűtést (lásd: Mélyhűtési módszerek) is elterjedten alkalmazzák házi tyúk ondójának *in vitro* megőrzésében. Ezzel a módszerrel kapcsolatban is számos kutatás született, Sasaki és munkatársai (2010) például 84%-os termékenységet értek el MA-használatával.

Vitrifikációs eljárás alkalmazását is kutatták több alkalommal, ám ezen módszer bizonyult eddig a legkevésbé alkalmasnak házi tyúk ondójának mélyhűtéses megőrzésére ezzel kapcsolatban 30-40%-os termékenységről számoltak be (Végi, 2017a).

Őshonos magyar kakasok ondómélyhűtésével kapcsolatban Barna és munkatársai (2008) a lassú, programozott eljárással több élő spermiumot találtak a felolvasztott mintákban, mint a nitrogéngőzös módszernél, ám mindkét protokoll alkalmasnak bizonyult a fajtacsoport ondójának *in vitro* megőrzésére. Váradi (2016) a pelletmódszer esetében 44%, míg lassú, programozott eljárással 32%-os termékenységről számolt be.

2.5. Antioxidáns védelmi rendszer:

A spermiumok termékenyítőképességének védelme kapcsán alapvető feladat a sejtek környezetének olyan megőrzése vagy kialakítása, mely hozzájárul azok homeosztázisának fenntartásához és ez által életben tartásához. A sejtek, így a spermiumok belső homeosztatikus egyensúlyának része a szabadgyök-antioxidáns egyensúly (Blázovics, 2015), mely a spermiumokat érő stresszhatások során felborulhat, ezért érdemes lehet ennek támogatása érdekében antioxidáns-kiegészítést alkalmazni az ondóhígítókban (Khan, 2011, Pegg, 2014).

2.5.1. Szabadgyök-antioxidáns egyensúly:

A mai széleskörű ismeretünk a szabadgyökökről és ahhoz kapcsolódóan az élő szervezetek redox-homeosztázisáról igen különböző tudományágak összekapcsolódó kutatásai révén jöhetett létre. A szabadgyökök olyan, kémiaiilag aktív, rövid életű molekulák, melyek külső elektronhéjukon párosítatlan elektronnal rendelkeznek (Blázovics, 2015).

A szabadgyököket csoportosíthatjuk aszerint, hogy a párosítatlan elektronnal rendelkező molekulák, vagy molekularészek milyen központtal rendelkeznek, ezek szerint az élő szervezetekben legjelentősebbek a reaktív oxigén (ROS), nitrogén (RNS), kén (RSS) és karbonil (RCS) szabadgyökök (Cadenas, 1989). Jelen kutatás szempontjából a leggyakrabban

előforduló reaktív oxigén szabadgyököket kell megemlíteni, ezek a szuperoxid ($\text{O}_2^{\bullet-}$), a hidroxil ($\text{HO}^{\bullet}$), a hidroperoxil ($\text{HOO}^{\bullet}$), a peroxil ($\text{ROO}^{\bullet}$), az alkoxyl ($\text{RO}^{\bullet}$), és a lipid peroxil ($\text{LOO}^{\bullet}$), illetve bár nem gyök természetűek, reakciókészségük okán mégis ide soroljuk például a hidrogén peroxidot (H_2O_2), a hipoklórossavat (HOCl), vagy a szinglet oxigént (IO_2) (Matsuo & Kaneko, 2000)

Szabadgyökök a szervezet normál anyagcsere folyamatai során is keletkeznek, például a terminális oxidáció közben, a drogmétabolizáló enzimrendszer működése alatt, a mikroszómákban, a prosztaglandin bioszintézisekor, a NO-szintáz aktivitása során, vagy a fehérvérsejtek „oxidative burst”-ja alatt stb. (Blázovics, 2015). Az így keletkezett szabadgyökök fontos szerepet játszanak például a sejtciklus és a metabolikus folyamatok szabályozásában, a patogének elleni védelemben, vagy a jelátvitelben (Borbély és Róth, 2015). Egészséges körülmények között a szervezet védelmi rendszere semlegesíti a szükségtelen mennyiségű szabadgyököket, melyre azért van szükség, mert a szabadgyökök képesek a sejtek saját anyagaival, így a lipidekkel, az RNS és DNS-el és a fehérjékkel is reakcióba lépni, így károsítva azokat. (Marczell, 2015). A sejtek normál működése során képződő, ún. intrinsic szabadgyökökön túl külső tényezők is kiválthatnak ún. extrinsic szabadgyökképződést, ilyen például az ondomélyhűtés során a hirtelen hőmérsékletváltozás (Marczell, 2015, Partyka & Nizański, 2021).

A szabadgyökképződéssel a szervezet hármas védelmi rendszere igyekszik felvenni a versenyt. Az elsődleges és másodlagos védelmet a különböző antioxidánsok adják. Elsődlegesek az enzimatisz antioxidánsok, mint a szuperoxid-dizmutázok, a katalázok, a peroxidáz, a glutation-S-transzferáz, a DT-diaforáz és a reduktázok. Másodlagosak a nem enzimatisz antioxidánsok és más” scavenger” molekulák (kofaktorok, vitaminok, fenolok kinolok, bilirubin stb.), harmadlagos védelmi tényezők azok a repair mechanizmusok, melyek a károsodott anyagok degradátumait eliminálják (Borbély & Róth, 2015). Azt az állapotot, mikor ezen védekező rendszer nem képes a keletkező szabadgyököket kellő mértékben hatástalanítani oxidatív stressznek nevezik (Sies, 1985).

Az oxidatív stresszre és a különböző betegségekre irányuló, főként az 1970-es évektől kezdődő kutatások bebizonyították, hogy a legtöbb vizsgált betegség egyik kiváltó oka a védelmi rendszert meghaladó szabadgyökök fokozott jelenléte volt. Illetve számos esetben bebizonyosodott, hogy a szervezetben keletkező (endogén) antioxidánsokon túl a bevitt (exogén) antioxidánsok jelenléte is nélkülözhetetlen, ám túladagolásuk ugyancsak káros (Blázovics, 2017).

Az antioxidánsok, melyek definíció szerint olyan anyagok, melyek az oxidációt gátolják vagy késleltetik, nagyon tág csoportot képeznek. Ezeket az anyagokat általánosságban két csoportra osztják az aktivitásuk alapján, enzimatis és nem enzimatis antioxidánsokra, mely csoportok bemutatására külön ki szeretnék térni (Khan, 2011).

2.5.2. Enzimatis antioxidánsok

A reaktív oxigén szabadgyökök (ROS) káros hatásai elleni védelem első védvonalát alkotó enzimatis antioxidánsok közül az ondóban legjelentősebbek a szuperoxid-dizmutáz (SOD), a kataláz (CT), és a glutaion-peroxidáz (GSH-Px), ezen enzimek csupán kis mennyiségben találhatók az ondóban, ezért a spermiumok fokozottan kitettek az oxidatív stressz károsításának (Kowaczuk, 2022).

A SOD a mitokondriális működés során képződő szuperoxid anionokat oxigén molekulává és hidrogénperoxiddá alakítja (Griveau et.al., 1995). A SOD-ok annak megfelelően csoportosítjuk, hogy mely kofaktorhoz kapcsolódnak, lehetnek például mangánfüggők (Mn-SOD), ezek a mitokondriumokban fejtik ki hatásukat, és nagyobb részt a spermiumokban vannak jelen, illetve lehetnek a citoplazmában működő cink és réz (Zn-SOD, Cu-SOD) kofaktorokkal rendelkező formák, melyek főként az ondóplazmában vannak jelen (Michalski, 1992, Surai, et.al. 1998b). A keletkező hidrogén-peroxidot, mely ugyancsak spermiumkárosító, a CT és GSH-Px enzimek redukálják, így víz és oxigén molekula keletkezik. A GSH-Px „sokoldalúbb” a katalázhoz képest, ugyanis szelénnel kapcsolódott formája a hidrogén-peroxid mellett a lipid-hidroperoxiddal is reagál (Lawrence & Burk, 1978, Surai et.al. 1998a). Ez a forma adja a házi tyúk spermiumainak teljes enzimaktivitásának több mint 75%, mely aktivitás alapvetően függ az állatok exogén szelénellátottságától (Surai et.al.1998b).

Emlősökkel (vaddisznó, nyúl, ló, szamár, juh, bika és ember) összehasonlítva a spermiumok SOD aktivitása a madárspermiumokban alacsonyabb (Mannella & Jones, 1980). Az egyes enzimatis antioxidánsok aktivitásának megoszlása a különböző baromfifajokban eltérő, mely összefügg a fajokra jellemző ondó zsírsavösszetételével és a spermiumok aerob és anaerob anyagcsere-folyamatainak megoszlásával (Surai et.al. 1998a).

2.5.3. Nem enzimatis antioxidánsok

A szabadgyök-antioxidáns egyensúly fenntartásának másodlagos fenntartói a nem enzimatis antioxidáns tulajdonságokkal rendelkező anyagok, melyek képesek a radikális

gyökök okozta peroxidációs láncreakciókat megszüntetni. Ebbe a csoportba számos anyag tartozik melyek száma a folyamatos kutatások miatt folyamatosan bővül. Legjelentősebb nem enzimatis antioxiánsok például, egyes vitaminok (E-, A- vagy C-vitamin), a flavonoidok és más vitaminszerű anyagok, a karotinoidok, a telítetlen zsírsavak, vagy bizonyos vegyértékváltásra hajlamos fémek (Moussa, 2019, Blázovics, 2015).

A baromfik ondominonőségének megőrzése kapcsán ki kell emelni néhány fontos, nem-enzimatis antioxiánst.

Az E-vitamin (α -tokoferol), melyet baromfiondóban elsőként 1981-ben mutattak ki, a házi tyúkondót illetően 88%-ban a spermiumsejtekben található, és a membránok lipidperoxidációjának gátlásában kulcsfontosságú. A kakasok kiöregedésével együtt járó gyengülő termékenység kialakulásához a herékben lévő csökkenő E-vitamin szint is hozzájárul (Surai, et.al. 1997, Khan, 2011).

A C-vitamin, amit a baromfik természetes módon maguk is képesek szintetizálni, komplex módon járul hozzá a termékenység fenntartásához és növeléséhez. A különböző expozíciók, hatására, amilyen a hűtésnek való kitettség is, azonban a termelt C-vitamin mennyisége nem képes kielégíteni a szervezet (így a sejtek) szükségletét, ilyenkor nagy jelentősége van az exogén C-vitamin-kiegészítésnek (Nockels, 1984, Khan, 2011). Madárondóban a C-vitamin adja a plazma antioxiáns-kapacitásának mintegy 65%-át (Nowaczewski & Kontecka, 2005). A C- és E-vitaminok egymást erősítve vesznek részt az oxidatív stresszel szembeni védelemben, melyet takarmányban és ondóhígítóban szerepeltetett kiegészítéssel is lehet támogatni (McDaniel, et.al. 1998, Min, et.al. 2016).

A szelén egy mikroelem, melynek különösen nagy jelentősége van az állati reprodukcióban. Elsődleges jelentősége, hogy esszenciális komponense a GSH-Px enzimatis antioxiánsnak, emellett bizonyos fehérjékkel kapcsolódva is antioxiáns hatású. A szelén esszenciális jellegéből adódóan a GSH-Px aktivitása is az exogén szelénellátástól függ, így hiányos bevitel esetén ezen enzimatis antioxiáns funciója is gátlódik (Khan, 2011). Szelénhiány esetén csökken a kakasok Sertoli- és Leydig-sejtjeinek száma és a tesztoszteron-termelése (Edens & Softon, 2002). A szelénkiegészítés segít megőrizni az ondó minőségét és a spermiumok ellenállóképességét a tárolás alatt (Dimitrova, et.al. 2007). Az utóbbi időben számos kutatás foglalkozik a szelén különböző vegyületeinek hasznosíthatóságával, azt találták, hogy a legjobb antioxiáns-hatással az elemi, nano méretű szelén bír, mely alkalmazása az ondóhígítóban javítja a kakasspermiumok minőségét krioprezervációt követően (Safa, et.al. 2016, Ibrahim, et.al. 2022).

Az L-karnitin (LC) aminosav-származék, mely esszenciális aminosavakból, metioninból és lizinből szintetizálódik. Az L-karnitin alapvető szerepe a zsírsavak sejten belüli mobilizációja a mitokondriumokba. Emellett jelentős antioxidáns tulajdonsággal is bír. Ezen két jellemzője miatt kiemelten fontos szerepe van az ondó minőségének megőrzésében. Az L-karnitin jelen van az ondóplazmában és a spermiumokban is. Zsírsav-mobilizációs sajátossága révén csökkenti a peroxidációra hajlamos, többszörösen telítettlen zsírsavak mennyiségét, ezzel együtt növelve azok mitokondriális lebontását a β -oxidáció során, amivel hozzájárul a mitokondriumok energia-termelésének növekedéséhez, így fokozza a spermiumok motilitását. Antioxidánsként képes a szabad vassal kelátot képezni, ezzel mérsékli a ROS-ök keletkezését, valamint a SOD-zal alkotott szinergista kapcsolat folytán támogatja a spermiumok lipidperoxidációjának csökkentését (Khan, 2011). Ilyen együttműködésről több esetben is beszámoltak antioxidánsok esetében házi tyúk fajnál (Attia, et.al. 2019, Eid.et.al. 2006)

L-karnitinnal történő ondóhígító-kiegészítéssel kapcsolatban a házi tyúk vonatkozásában több kísérlet is megvalósult korábban. Először S. Tabatabaei és A. Aghaei (2011) alkalmazta az L-karnitinnal kiegészített ondóhígítót tyúk fajban. 4°C-on 24 órán keresztüli tárolást követően a kiegészítésnek pozitív hatása volt a motilitás és az életképesség megőrzésére. Az LC ondómélyhűtés utáni hatásait Fattah és munkatársai (2017) vizsgálták először, ugyancsak kakasoknál. Azt találták, hogy krioprezervációt követően a kiegészített ondó minősége szignifikánsan jobb volt a kontrollhoz viszonyítva. Az L-karnitines kiegészítés csökkenti a krioprezerváció okozta DNS-fragmentációt és az apoptózis okozta spermiumelhalást (Partyka, et.al. 2017). Ezen eredmények ellenére Pranay Kumar és munkatársai (2019), akik vizsgálták az ondó termékenyítő képességét és a keltethetőséget is, nem tapasztaltak javító hatást az L-karnitines kiegészítés kapcsán.

A szericin, az házi selyemhernyó (*Bombix mori*) gubóit alkotó egyik fehérje. A gubót több mint 70%-ban alkotó fibroin szálakat, a 20-30%-ot kitevő szericin glikoprotein tartja össze. A fibroin-szericin kompozit forró víz hatására szétbomlik, ezt követően a szericin szeparálható. Bioaktív, mechanikai és kémiai tulajdonsága miatt a szericint számos területen hasznosítják, így a szépség-, élelmiszer- és gyógyszeriparban és különböző biológiai kutatásokban (Kundu, et.al. 2008).

A szericin antioxidáns hatásáról elsőként Kato és munkatársai (1998) számoltak be. A szericin képes volt a lipidperoxidáció mérséklésére patkányagy homogenizátumban. Mélyhűtőközegben alkalmazva a szericin alkalmasnak bizonyult a hagyományos sejtvédő szérum kiváltására különböző emlőssejtek esetében (Kato et.al. 2005). Krioprotektív hatásról számoltak be Ohnishi és munkatársai (2011) is a szericinkiegészítés kapcsán.

Ondómélyhűtés vonatkozásában a szericin alkalmazása növelte a csődörspermiumok DNS-integritását és ellenállóképességét a reaktív oxigén gyökök káros hatásaival szemben (Nasirabadi, et.al. 2019). Egér- és bikaondót illetően hasonló spermiumvédő tulajdonság tapasztalható (Ghasemi, et.al. 2018, Yangngam et.al. 2021). Házi tyúk fajnál szericin ondóhígítóban történő alkalmazását és annak hűtött tárolást (5°C-on 5 napig) követő hatásáról Sonseeda és munkatársai (2015) számoltak be, jelen ismereteink szerint egyedül, ők a kiegészítés minőségmegőrző hatásáról számoltak be. Kakasondó krioprezerválása kapcsán nincs tudomásom más, ondóhígítóban alkalmazott szericinkiegészítéses kutatásról.

2.5.4. Az oxidatív stressz és az ondómélyhűtés alapproblémája

A redox-homeosztázis fenntartása az ondó esetében is kulcsfontosságú, a termékenyítőképesség megőrzése szempontjából. Bizonyos ROS-szint szükséges a spermiumok normál működéséhez, például a szuperoxid anionnak fontos szerepe van a kapacitációban és az akroszóma-reakció során (Agarwal et al., 2003). Ellenben ROS-ek túlzott jelenléte káros a hímivarsejtekre (lásd: Szabadgyök-antioxidáns egyensúly).

Spermiumok kapcsán a ROS-ek elsősorban a sejtmembránt károsítják, ugyanis azok nagy arányban tartalmazzak PUFA-kat, melyek lipid-peroxidációra fogékonyak (lásd: A madárspermium felépítése). A lipid-peroxidációs mechanizmust feloszthatjuk három fázisra. Az első fázis az iniciáció, ilyenkor a PUFA-tól valamely szabadgyök hidrogéniont vesz el, így a zsírsav ugyancsak gyökké válik. A második, propagáció fázisában a zsírsav-gyök a környezetében lévő többi PUFA-kkal is reakcióba lépve egy kaszkád mechanizmust indukál, melynek következtében a harmadik, terminációs fázisban a zsírsavak töredezése során nagyszámú reaktív anyag (izoprosztánok, szénhidrogének és aldehidek) jön létre. A károsodást különböző fémek növelhetik, ezek katalizátorai ezen folyamatoknak (Marczell, 2015). Az antioxidánsok képesek az egyes fázisok szintjén a peroxidációt gátolni, ezzel védve a spermiumok membránszerkezetét, ennek különösen nagy jelentősége van, a krioprezerváció során, ugyanis ekkor a kívánt cél, vagyis az ondó minőségének megőrzése érdekében a spermiumokat a hűtés és felolvasztás során jelentős stressznek vannak kitéve, mely tovább növeli a ROS-koncentrációt (Khan, 2011).

3. ANYAG ÉS MÓDSZER

3.1. Kísérleti állatok és elhelyezésük

A kísérletek elvégzéséhez 15 db, 1 éves fogolyszínű kakast helyeztünk el egyedi mélyalmos ketrecekben.

Az állatok az intézet által az őshonos magyar tyúkfajtákra optimalizált tojótápot és a vizet *ad libitum* kapták.

Az állatokat 14L:10D megvilágítás mellett tartottuk (2.ábra).



2. ábra: A kakasok elhelyezése (Fotó: NBGK-HGI)



3. ábra: Ondóvétel (Saját fotó)

3.2. Ondógyűjtés és minősítés

Az ondógyűjtés a trenírozást követően hetente kétszer történt, mely során Burrows és Quinn (1937) dorso-abdominális masszázsmódszerét használtuk. A vizsgálatokhoz kevert ondómintákat használtunk. 3. ábra Ondóvétel (3.ábra)

Az ondóminősítés során a motilitást **szubjektív becsléssel**, illetve **CASA** (Microptic S.L. SCA[®]) rendszerrel határoztuk meg. A szubjektív becslés során 10µl ondómintát cseppentettük tárgylemezre, fedőlemezt helyeztünk rá és mikroszkópban 10-es objektívvel 0-5-ig terjedő skálán értékeltük. A szubjektív becslést mindig ugyanaz a személy végezte.

A CASA rendszerrel történő vizsgálathoz az ondót 60-szorosára hígítottuk, majd a mintát 38°C-ra fűtött tárgylemezre cseppentve, fedőlemez alatt vizsgáltuk meghatároztuk a motilis és inmotilis sejtek arányát.

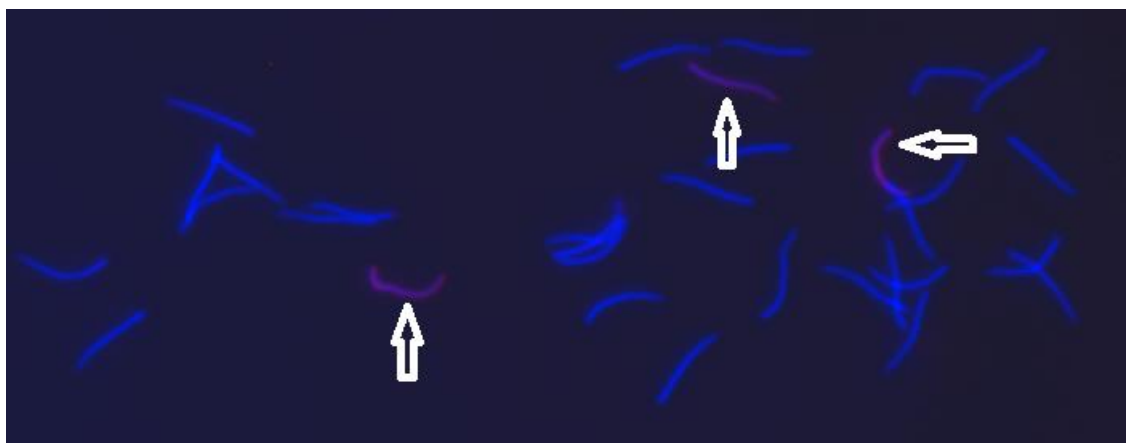
A spermiumkoncentrációt spektrofotométer (Accucell IMV) segítségével állapítottuk meg.

Az élő, holt, illetve rendellenes morfológiájú spermiumok arányát membrán-permeabilitáson alapuló **vitális festés** (anilin-eozin) segítségével állapítottuk meg (4.ábra). A festés során 20 µl festékhez 10 µl ondót mértünk, ebből 10 µl-t tárgylemezre cseppentettük, széleztettük és hajszárítóval fixáltuk. Az így elkészített keneteket mikroszkóp alatt 1200-szoros nagyítás alatt értékeltük. Minden kenetben 200 sejtet vizsgáltunk meg.



4. ábra: Vitális festés (Fotó: NBGK-HGI)

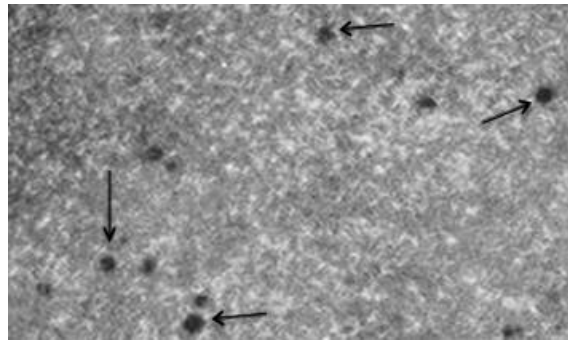
A **DNS-fragmentáltságot** In Situ Cell Death Detection Kit, TMR red (© Merck KGaA) felhasználásával a gyártó által ajánlott módon vizsgáltuk.



5. ábra DNS-fragmentáltságot kimutató festés. A kék spermiumok épek, a lilák (nyíllal jelöltek) DNS-fragmentáltak (Fotó: NBGK-HGI)

A spermiumok életképességének és termékenységének ellenőrzésére, egy úgynevezett többfunkciós **membránteszt** (*In vitro* sperm-egg interaction assay) általunk módosított változatát használtuk. Ennek során 5-szörösére hígított ondóból, annak koncentrációja alapján kimértünk 25 millió spermiumnak megfelelő mennyiséget, amit 1 ml 38°C-os DMEM-oldathoz adtunk. Ez után előzőleg kipreparált kb. 5x5 mm-es szikhártya-metszetet helyeztünk a keverékbe, melyet 5 percen keresztül 38°C-os vízfürdőben kevertünk. Majd a membránokat 10-szeres objektív alatt vizsgáltuk. A tesztet minden mintánál 3 ismétlésben végeztük, és minden ismétlésben 3 látótérben számoltuk meg a penetrációs nyílások mennyiségét (6. ábra).

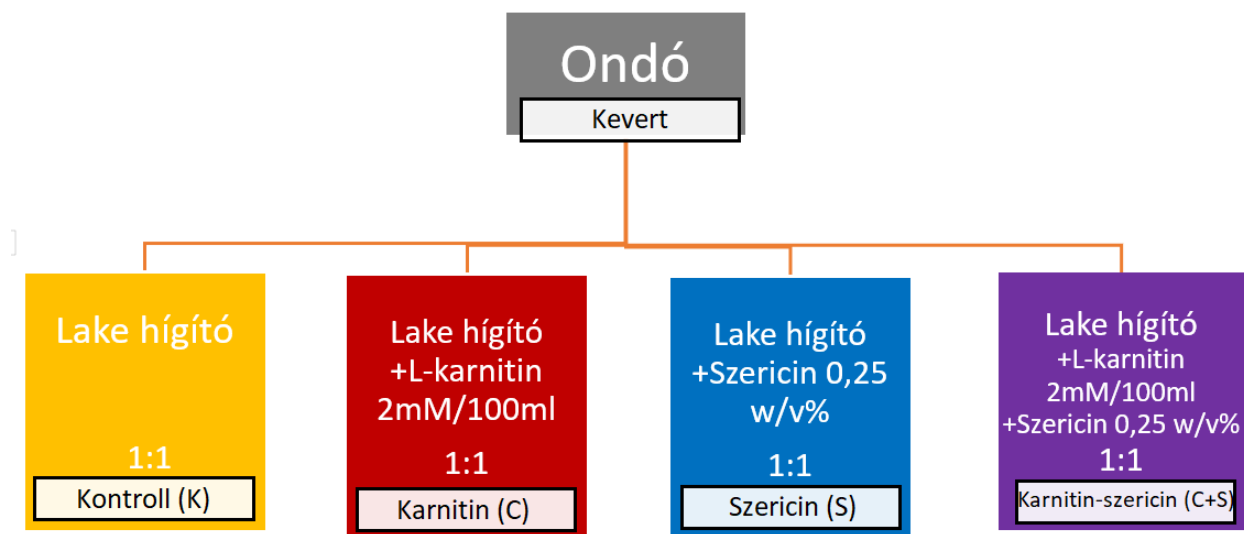
A különböző vizsgálatokat a mélyhűtés előtti friss, és a felolvasztott mintákat illetően is elvégeztük.



6. ábra: Membrán penetrációs nyílásokkal (nyilak mutatják) (Fotó: NBGK-HGI)

3.3. Ondókezelés és mélyhűtés

A levett ondót 4 felé osztottuk. Az így kialakított csoportokat 1:1 arányban szobahőmérsékleten hígítottuk. A hígítókban, a 7. ábrának megfelelően antioxidáns-kiegészítést alkalmaztunk, mely szerint a **kontroll** csoport (K) esetében kiegészítés nélküli hígítót használtunk, a **karnitin** csoportnál (C) 2mM/100ml L-karnitinnel, a **szericin** csoportnál (S) 0,25 w/v% szericinnel és a **karnitin-szericin** csoportnál (C+S) 2mM/100ml L-karnitinnel és 0,25 w/v% szericinnel egészítettük ki a hígítót.



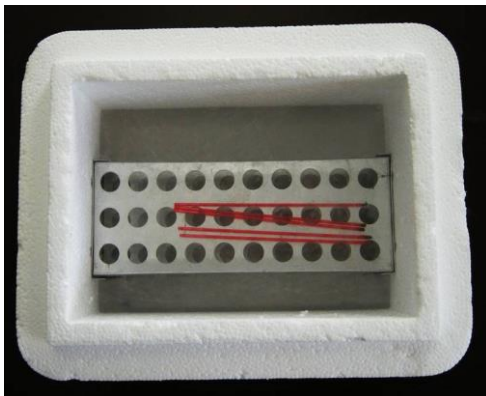
7. ábra: A csoportok kialakítása, antioxidáns-kiegészítés

A hűtés során a nitrogéngőzös eljárást alkalmaztuk. a mintákat 30 percig, 4 °C-on equilibráltuk, majd krioprotektánsként 6% DMA-t adtunk. Ezt követően 0.25 ml-es műszalmákba töltöttük az ondót. A műszalmák végeit aktív szénnel zártuk.

A mélyhűtéshez a műszalmákat expandált polisztirol (EPS) dobozban 15 percre folyékony nitrogén felszínétől 5 cm-re helyeztük el, majd további folyékony-nitrogén-

feltöltéssel ezt a távot 1 cm-re csökkentettük újabb 15 percre (8. ábra). Ez után folyékony nitrogénes mintatároló tartályba helyeztük a szalmákat.

1 hónap elteltével az ondóminták felolvasztását 3,5 °C-os vízfürdőben végeztük.



8. ábra: Nitrogéngőzös hűtés (Fotó: NBGK-HGI)

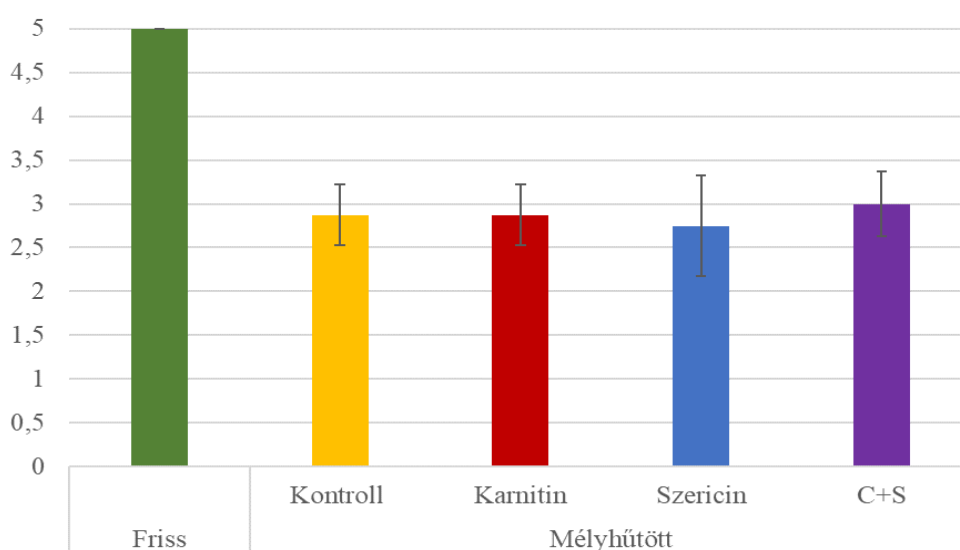
3.6. Statisztikai analízis

Az adatok értékeléséhez a Statistica 13.0 (Statsoft Hungary) programot használtuk. A Shapiro-Wilk teszttel történő normalitásvizsgálat után a nem normál eloszlású adatok esetén a Kruskal-Wallis ANOVA, illetve a Kolmogorov-Smirnow two-sample tesztet alkalmaztuk. A normál eloszlású adatok értékelését egyutas ANOVA-val, valamint Tukey post-hoc tesztel végeztük.

4. EREDMÉNYEK

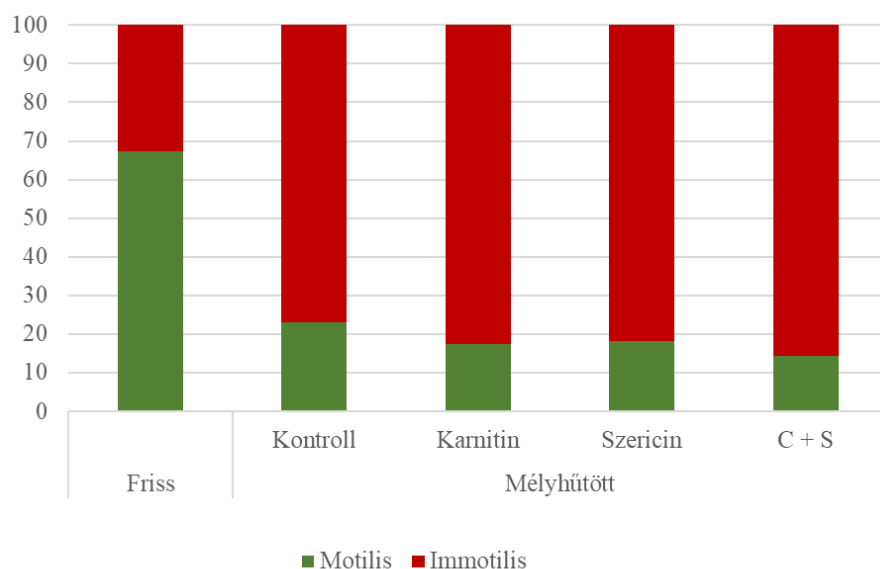
4.1. A motilitásvizsgálat eredményei

A szubjektív motilitásvizsgálat során a frissen levett ondóban a spermiumok motilitása minden esetben 5-ös értékelést kapott. Felolvasztást követően a spermiumok motilitása az összes csoportban szignifikánsan csökkent a friss ondóéhoz képest ($p \leq 0,01$). A felolvasztott ondóban a csoportok között nem találtunk szignifikáns különbséget, itt az átlagértékek 2,8 és 3 között változtak (9. ábra).



9.ábra: Szubjektív motilitásvizsgálat eredményei a friss és a felolvasztott mintákban (0-5-ig)

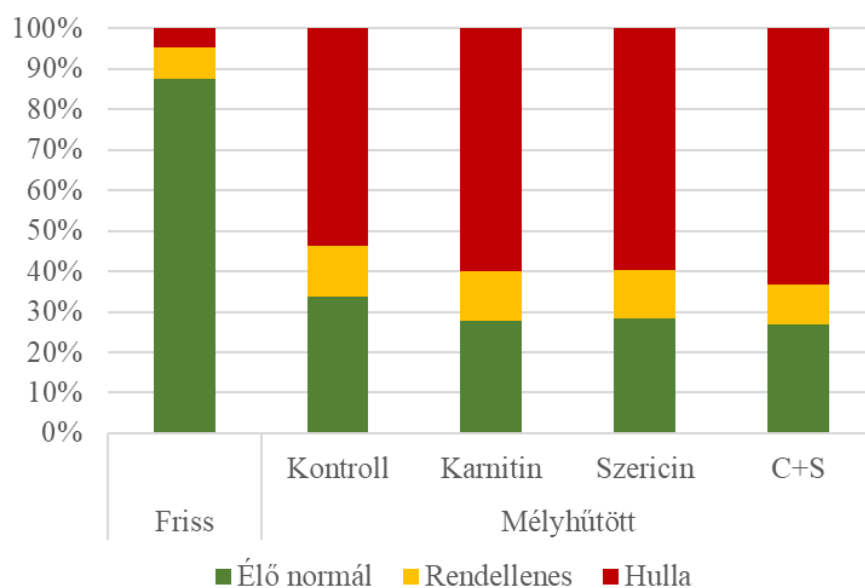
A CASA rendszer által mért motilitásadatok alapján, a friss ondóban a motilis spermiumok átlagosan 67%-ot, a felolvasztott mintákban átlagosan 14-23%-ot tettek ki. Összehasonlítva az egyes csoportok motilis és immotilis spermiumainak megoszlását azt tapasztaltuk, hogy a friss ondóminta tartalmazta a többi csoporthoz képest szignifikánsan a legtöbb motilis ($p \leq 0,01$) és ennek megfelelően a legkevesebb immotilis ($p \leq 0,01$) spermiumot. Az egyes felolvasztott csoportokat egymáshoz viszonyítva nem találtunk lényeges különbséget (10. ábra).



10. ábra: A motilis és immotilis spermiumok megoszlása a friss és a felolvasztott mintákban

4.3. Az anilin-eozin festett kenetek vizsgálatának eredményei

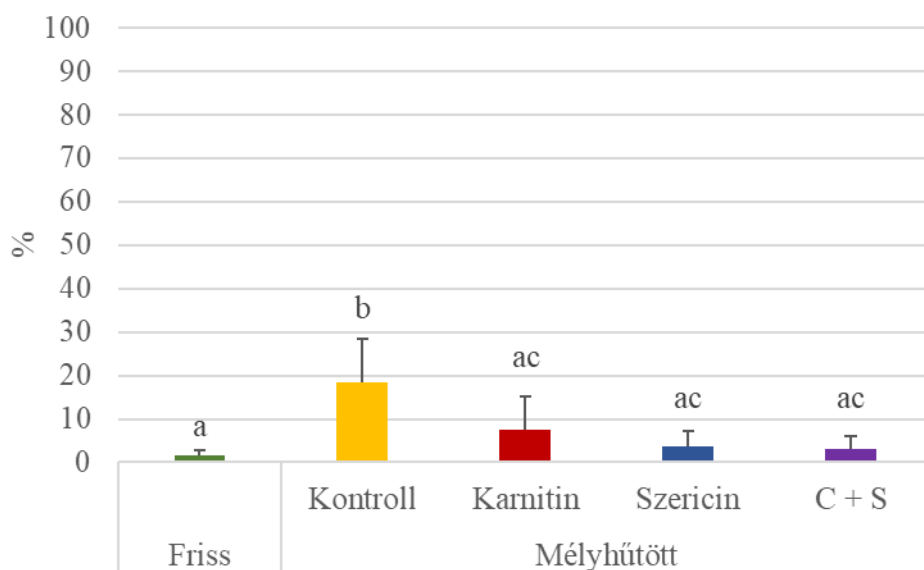
A vizsgálat adatai alapján átlagosan a friss spermiumok 87%-a volt élő és 5%-a holt. A felolvasztott mintákban átlagosan 27-34% élő és 54-63% holt spermiumot találtunk. Az abnormalis spermiumok 8-13%-ot tettek ki átlagosan a csoportokban. Megállapítható, hogy az eddigieknek megfelelően, a mélyhűtést követően az élő, ép spermiumok aránya szignifikánsan csökkent ($p \leq 0,01$), míg a holtaké szignifikánsan nőtt ($p \leq 0,01$). Az abnormalitások változásában nem volt igazolható eltérés (11. ábra). A felolvasztott mintákat összehasonlítva sehol nem volt szignifikáns különbség.



11. ábra. Az élő ép; a morfológiailag rendellenes és elhalt sejtek aránya a friss és a felolvasztott mintákban.

4.4. DNS-fragmentációs vizsgálat eredményei

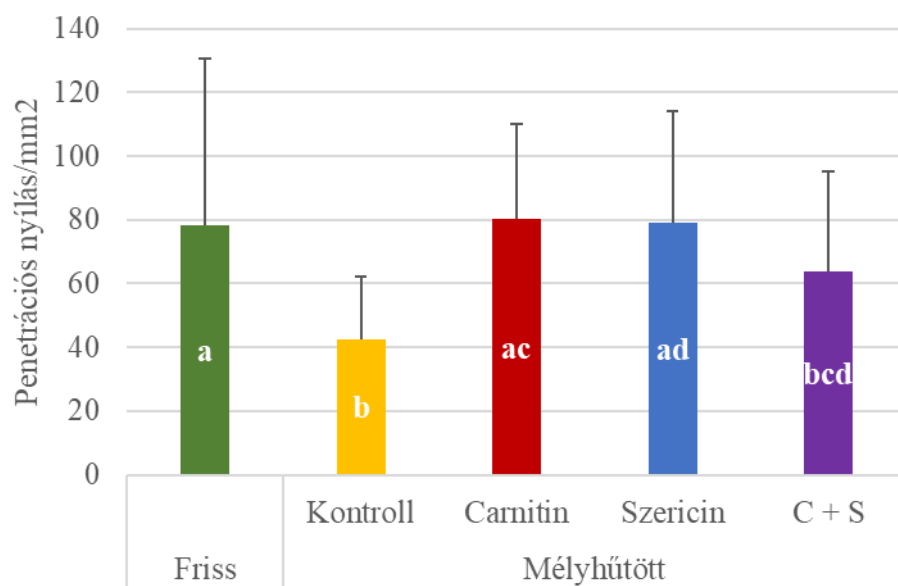
A DNS-fragmentált spermiumok előfordulása az egyes csoportokban átlagosan 1,57% és 18,35% között alakult, legtöbb ilyen sejtet a kontroll, míg legkevesebbet a friss ondó mintákban találtuk. Megállapítható, hogy a mélyhűtés és felolvasztás során csak a kontroll csoportban találtunk szignifikánsan több DNS-károsodást a frisshez képest ($p \leq 0,05$). A C, S és C+S csoportokat a K-val összehasonlítva azt tapasztaltuk, hogy az antioxidánssal kiegészített mintákban bizonyíthatóan kevesebb DNS-fragmentált sejt volt (K-C; K-S; K-C+S: $p \leq 0,05$) (12.ábra).



12. ábra: A DNS-fragmentált spermiumok előfordulása a csoportokban
Az eltérő betűk (a; b; c) jelzik a szignifikáns különbségeket (a-b és b-c $p \leq 0,05$).

4.5. Membráneszt eredményei

Az in vitro membráneszt során azt tapasztaltuk, hogy a csoportok spermiumai átlagosan 43-80 db nyílást produkáltak mm^2 -enként a membránokon. Legkevesebbet a kezeletlen felolvasztott csoport érte el, melyhez képest a friss, illetve az L-karnitin- (C) és szericinkiegészítéses (S) csoportnál is szignifikánsan több nyílást találtunk (K-friss: ($P \leq 0,01$); K-C, K-S: ($p \leq 0,05$)). Emellett a friss spermiumokhoz viszonyítva a C+S csoport szignifikánsan kevesebb nyílást produkált ($P \leq 0,05$).



13. ábra: Az egyes csoportok spermiumai által okozott penetrációs nyílások egységnyi területre vonatkoztatott átlagos száma. Az eltérő betűk jelzik a szignifikáns különbségeket a,b,c,d; $\leq 0,05$

5. KÖVETKEZTETÉSEK

A baromfi fajok *in vitro* génmegőrzésének, jelenleg leghatékonyabb módja az ondómélyhűtés. Azonban a madárspermiumok az emlősökéhez képest kevésbé viselik el a mélyhűtéssel és felolvasztással járó változásokat. Ennek fő oka, hogy a hímivarsejtek membránjait nagyobb arányban alkotják többszörösen telítetlen zsírsavak (PUFA), melyek hajlamosak a reaktív oxigén szabadgyökök (ROS) által okozott lipidperoxidációra, ami a sejtek pusztulását okozhatja, ha nem áll rendelkezésre elegendő, szabadgyököket semlegesítő antioxidáns. Ezért lehet szerepük az ondóhígítókban alkalmazott antioxidáns-kiegészítésnek.

A kutatásom célja, az L-karnitin és szericin antioxidánsok ondóhígítóban történő alkalmazásának hatásvizsgálata, az őshonos magyar kakasok ondómélyhűtési eredményeinek fejlesztése érdekében.

Az L-karnitin természetes körülmények között is jelen van az ondóplazmában és a spermiumokban. Zsírsav-mobilizációs sajátossága révén csökkenti a peroxidációra hajlamos, többszörösen telítetlen zsírsavak mennyiségét, ezzel együtt növelve azok mitokondriális lebontását a β -oxidáció során, amivel hozzájárul a mitokondriumok energia-termelésének növekedéséhez, így fokozza a spermiumok motilitását. A SOD-zal alkotott szinergista kapcsolat folytán támogatja a spermiumok lipidperoxidációjának csökkentését.

A szericin egy 18 féle aminosavból álló vízoldható fehérje, melyet a selyemhernyó gubójából állítanak elő. A gubóban a fibroinszállakat tartja össze, emellett antibakteriális és UV-védő hatása is ismert. Nagy koncentrációban tartalmaz szerint és treonint, melyek hatékonyan csökkentik az *in vitro* lipidperoxidációt és a tirozinázaktivitást. A szericin nem penetráló krioprotektánsként mérsékli az intracelluláris jégkristály-képződést, mely tulajdonsága csökkentheti a mélyhűtött spermiumok károsodását, amit már néhány fajban igazoltak.

L-karnitinnal történő ondóhígító-kiegészítéssel kapcsolatban a házi tyúk vonatkozásában néhány kísérlet már megvalósult korábban. Először Tabatabaei és Aghaei (2011) alkalmazta az L-karnitinnal kiegészített ondóhígítót tyúk fajban. 4°C-on 24 órán keresztüli tárolást követően a kiegészítésnek pozitív hatása volt a motilitás és az életképesség megőrzésére. Az antioxidáns ondómélyhűtés utáni hatásait Fattah és munkatársai (2017) vizsgálták először, ugyancsak kakasoknál. Azt találták, hogy a mélyhűtést és felolvasztást követően a kiegészített ondó minősége szignifikánsan jobb volt a kontrollhoz viszonyítva. Az L-karnitines kiegészítés csökkentette a krioprezerváció okozta DNS-fragmentációt és az apoptózis okozta spermiumelhalást (Partyka, et.al. 2017). Ezen eredmények ellenére Pranay

Kumar és munkatársai (2019), akik vizsgálták az ondó termékenyítő képességét és a keltethetőséget is, nem tapasztaltak javító hatást az L-karnitines kiegészítés kapcsán.

Jelen kutatás alapján elmondható, hogy Tabatabaei és Aghaei (2011) eredményeivel ellentétben Pranay Kumar és munkatársaival összhangban az L-karnitin-kiegészítés nem javította a spermiumok motilitását és az élő, ép sejtek arányát. A DNS fragmentáltság a karnitin kiegészítés hatására nem növekedett meg a felolvasztott mintákban, úgy ahogy azt Partyka et al (2017) is megállapította ($p \leq 0,05$), illetve szignifikánsan alacsonyabb volt a kontrol csoporthoz képest ($p \leq 0,05$). A spermiumok penetráló képessége is jobb volt az in vitro tesztek eredményei alapján a kontrol csoporthoz viszonyítva ($p \leq 0,05$).

A szericin antioxidáns alkalmazása az ondóhígítóban növelte Nasirabadi, et.al. (2019) kutatásában a ménspermiumok DNS-integritását és ellenállóképességét a reaktív oxigén gyökök káros hatásaival szemben, ezt egér- és bikaondót illetően Ghasemi, et.al. (2018) és Yangngam et.al. (2021) is megerősítette. Házi tyúk fajnál jelen ismereteink szerint egyedül Sonseeda és munkatársai (2015) számoltak be az ondóhígítóban alkalmazott szericin-kiegészítésről, ők 5°C-on 5 napig tárolták a mintákat mialatt ondóminőség-megőrző hatást tapasztaltak. Baromfi fajokban a mélyhűtéses tartósítás kapcsán nincs tudomásunk más, ondóhígítóban alkalmazott szericinkiegészítéssel kapcsolatos kutatásról.

Az általunk végzett kutatás alapján a szericinkiegészítésnek az eddigi tapasztalatokkal szemben nem csökkentette a holt és rendellenes morfológiájú sejtek gyakoriságát, valamint a motilitást sem javította. Azonban a DNS fragmentáltság előfordulására és a spermiumok penetráló képességére pozitív hatással volt.

Az antioxidánsok egymást erősítő hatásáról korábban többen is beszámoltak, például Eid és munkatársai (2006) a glutation-peroxidáz és az E-vitamin szinergista működését tapasztalták, ami a kakasok ondóminőségét javította. A mi kísérletünkben az L-karnitin és a szericin együttes alkalmazása kapcsán azt találtuk, hogy azok az ondóhígítóhoz adva szignifikánsan csökkentik a felolvasztást követően a DNS-károsodott spermiumok előfordulását a kezeletlen csoporthoz képest, a többi vizsgált paraméterben nem találtunk javító hatást.

Összességében elmondható, hogy a célkitűzésnek megfelelően sikeresen teszteltük az ondóhígítóban alkalmazott L-karnitin- és szericin-kiegészítés hatásait a felolvasztott ondó minőségére házi tyúk fajban. A bemutatott kutatásban az antioxidáns-kiegészítéssel kapcsolatban azonban nem tapasztaltunk a korábban a szakirodalomban leírt egyértelmű kedvező hatást. Mindez további kutatások elvégzésére ösztönöz, az őshonos fajok ondómélyhűtésének javítása érdekében, akár további anyagok felhasználásával vagy az

alkalmazott módszerek fejlesztésével. Ezen kívül a tapasztalt pozitív eredmények (DNS fragmentáció, *in vitro* membránteszt) termékenyítőképességre gyakorolt hatásának vizsgálatára mindenképpen szükséges a termékenyítési kísérletek elvégzése.

6. ÖSSZEFOGLALÁS

Az intenzív haszonállat fajták és hibridek térhódításával veszélybe kerültek azon géntartaléknak tekinthető őshonos fajtáink. A genetikai sokszínűségének megőrzése és fenntartása miatt fontos a génmegőrzés. Baromfifajtáink *in vitro* génmegőrzésének legelterjedtebb és legeredményesebb módja jelenleg az ondómélyhűtés.

Vizsgálatunk célja az őshonos fogolyszínű magyar tyúk ondómélyhűtésének fejlesztése, melyet jelen kutatásban ondóhígítóban alkalmazott antioxidáns-kiegészítéssel kívántuk megvalósítani.

Kísérletünkben 15 db, 1 éves fogolyszínű kakast mélyalmos ketrecekben helyeztünk el. Az ondóvétele heti két alkalommal történt, a friss kevert ondót négy részre osztottuk. A kontroll (K) mintához Lake-hígítót adtunk, az L-karnitinnel kiegészített (C) csoportnál 2mM/100ml L-karnitint, a szericinnel kiegészített (S) csoportnál 0,25 w/v% szericint kevertünk a Lake-hígítóba, emellett vizsgáltuk az antioxidánsok együttes hatásait a szericin-L-karnitinnel kiegészített (C+S) csoportban. A vizsgálatban meghatároztuk a friss és mélyhűtött/felolvasztott mintákban a spermiumok motilitását szubjektív becsléssel és CASA rendszerrel, életképességét és morfológiai épségét anilin-eozin-os vitális festetéssel, DNS-fragmentáltságát TUNEL Assay alkalmazásával és akroszómareakció-képességét *in vitro* membrántesztel. Az 5 C-os egyensúlyi állapot követően Krioprotektánsként 6 % DMA-t alkalmaztunk, majd a mintákat 15 percig 5 cm-rel és újabb 15 percig 1 cm-rel a folyékony nitrogén felszíne felett mélyhűtöttük. A felolvasztásokat 3,5 C-os vízfürdőben 1 perc alatt végeztük.

Az önmagában alkalmazott L-karnitin- (C) és szericinkiegészítés (S) nem javította a spermiumok motilitását, nem növelte az élő, ép sejtek arányát, viszont csökkentette DNS-fragmentált sejtek előfordulását, illetve megőrizték a spermiumok akroszómareakciós képességét a kontroll (K) csoporthoz képest. Az L-karnitin és szericin kombinációja (C+S) a kontroll (K) csoporttal összehasonlítva ki tudta védeni a DNS-károsodást, azonban a többi paraméterben nem találtunk szignifikáns különbséget.

Összességében az általunk alkalmazott antioxidáns-kiegészítésnek nem volt egyértelmű kedvező hatása a mélyhűtés eredményességére. A tapasztalt pozitív eredmények (DNS fragmentáció, *in vitro* membránteszt) termékenyítőképességre gyakorolt hatásának vizsgálatára mindenképpen szükséges a termékenyítési kísérletek elvégzése.

6. IRODALOMJEGYZÉK

- Agarwal A, Makker K. & Sharma R. (2008): Clinical relevance of oxidative stress in male factor infertility: an update. *Am J Reprod Immunol.* 59(1):2-11. p.
- Aire TA. (1982): The rete testis of birds. *J Anat.* 135(1):97–110.p.
- Aire, T.A. (2007): Anatomy of 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.
- Akiyama Y., Shinose M., Watanabe H., Yamada S., Kanda Y. (2019): Cryoprotectant-free cryopreservation of mammalian cells by superflash freezing. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA;* 116:7738–7743. p.
- 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.
- Attia, Y. A., El-Naggar, A. S., Abou-Shehema, B. M., & Abdella, A. A. (2019). Effect of Supplementation with Trimethylglycine (Betaine) and/or Vitamins on Semen Quality, Fertility, Antioxidant Status, DNA Repair and Welfare of Roosters Exposed to Chronic Heat Stress. *Animals,* 9(8), 547. p.
- Barbas, J. P., & Mascarenhas, R. D. (2008). Cryopreservation of domestic animal sperm cells. *Cell and Tissue Banking,* 10(1), 49–62.p.
- Barna, J., Végi, B., Váradi, É. (2008): Comparison of various freezing protocols of native rooster's semen. *Reproduction in Domestic Animals,* 43 (3) 139. p.
- Benk Á. (2019): Baromfitenyésztés jegyzet. Szegedi Tudományegyetem Mezőgazdasági Kar, Hódmezővásárhely. 115 p.
- Blázovics A. (2015): Oxidatív stressz biológiai rendszerekben. In: Blázovics A., Mézes M. & Róth E. (szerk.): *Oxidatív stressz és betegségek.* Szent István Egyetemi Kiadó Nonprofit Kft., Gödöllő, 244 p., 9-16 p.
- Blázovics A. (2017): A szabadgyök-kutatás évtizedei és magyar vonatkozásai. *Művelődés-, Tudomány- és Orvostörténeti Folyóirat.* 8, (14).133-148
- Blesbois, E. & Labbé, C. (2003): Main improvements in semen and embryo cryopreservation for fish and flow. In: Planchenault (Ed): *Cryopreservation of Animal Genetic Resources in Europe.* Paris, Bureau des Ressources Génétiques. 55-66. p.

- Bodó I. (1991): A géntartalékok megőrzése az állattenyésztésben. Akadémiai doktori disszertáció. Budapest. Kézirat. 184. p.
- Bodó I. (2001): Régi magyar háziállatfajtáink. https://szentistvancampus.unim.hu/documents/55526/96936/iii.1.tvsz_6.9f_volt_mkk_szakdolgozat_diplomadolgozat_20210423.pdf/b466541a-8620-e2ad-e9f5-bf24cd536a7f?t=1632923491554 (2022. szeptember)
- Bodó Sz.: Stratégiai géntartalék kialakításának lehetőségei. http://www.hermanottointezet.hu/sites/default/files/Haszon%C3%A1llat%20embriol%C3%B3giai%20kutat%C3%A1s%20%C2%20strat%C3%A9giai%20g%C3%A9ntartal%C3%A9k_Bod%C3%B3Sz.pdf (2022. szeptember)
- Bojic S., Murray A., Bentley B.L., Spindler R., Pawlik P., Cordeiro J.L., Bauer R., de Magalhaes J.P. (2021): Winter is coming: The future of cryopreservation. BMC Biol. 19:56. p.
- Borbély J. & Róth E. (2015): Oxidatív stressz labordiagnosztikai mérési lehetősége. In: Blázovics A., Mézes M. & Róth E. (szerk.): Oxidatív stressz és betegségek. Szent István Egyetemi Kiadó Nonprofit Kft., Gödöllő, 244 p., 38-45 p.
- Burrows, W.H and Quinn, J.P. (1937): The collection of spermatozoa from the domestic fowl and turkey. Poultry Science, 16, 19-24.p.
- Buss, E. G. (1993). Cryopreservation of Rooster Sperm. Poultry Science, 72(5), 944–954. p.
- Cadenas, E. (1989): Biochemistry of oxygen-toxicity. Annu. Rev. Biochem. 58, 79-110. p.
- Clulow, J., & Jones, R. C. (1982). Production, transport, maturation, storage and survival of spermatozoa in the male Japanese quail, *Coturnix coturnix*. Reproduction, 64(2), 259–266. p.
- Cornwall, G. A., & Hann, S. R. (1995). Transient appearance of CRES protein during spermatogenesis and caput epididymal sperm maturation. Molecular Reproduction and Development, 41(1), 37–46. p.
- Creemers, E., Nijs, M., Vanheusden, E., & Ombelet, W. (2011). Cryopreservation of human sperm: efficacy and use of a new nitrogen-free controlled rate freezer versus liquid nitrogen vapour freezing. Andrologia, 43(6), 392–397.p.
- Darin Bennett, A. and White, I. (1977) Influence of the cholesterol content of mammalian spermatozoa on susceptibility to cold-shock. Cryobiology 14: 466-470.p.
- Delany, M.E. (2000): Importance of biodiversity preservation for research and industry. Proc. XXI. World's Poultry Congress, Montreal, Kanada

- Dimitrov, S. G., Atanasov, V. K., Surai, P. F., & Denev, S. A. (2007): Effect of organic selenium on Turkey semen quality during liquid storage. *Animal Reproduction Science*, 100(3-4), 311–317.p.
- Donoghue, A.M. & Wishart, G.J. (2000): Storage of poultry semen. *Anim. Reprod. Sci.* 62: 213-232. p.
- Edens, F.W. and A.E. Sefton. (2002): Selenomethionine supplementation to diets of broiler breeders improves performance. *Poult. Sci.* 80(1):91.p.
- Ehling C, Taylor U, Baulain U, Weigend S, Henning M & Rath D. (2012): Cryopreservation of semen from genetic resource chicken lines. *Agriculture Forestry Research*, 62: 151-158.p.
- Eid, Y., Ebeid, T. and Younis, H. (2006): Vitamin E supplementation reduces dexamethasone-induced oxidative stress in chicken semen. *British Poultry Science* 47: 350-356.p.
- Fahy, G. M., & Wowk, B. (2014). Principles of Cryopreservation by Vitrification. *Methods in Molecular Biology*, 21–82. p.
- Fattah, A., Sharafi, M., Masoudi, R., Shahverdi, A., Esmaeili, V., & Najafi, A. (2017): l - Carnitine in rooster semen cryopreservation: Flow cytometric, biochemical and motion findings for frozen-thawed sperm. *Cryobiology*, 74, 148–153.p.
- Forbes, R.J. (1958): *Studies in Ancient Technology*, Vol. 6. Hollandia: Brill.
- Fujihara, N. (1992). Accessory reproductive fluids and organs in male domestic birds. *World's Poultry Science Journal*, 48(01), 39–56. p.
- Fujihara, N., & Howarth, B. (1978). Lipid Peroxidation in Fowl Spermatozoa. *Poultry Science*, 57(6), 1766–1768. p.
- FAO (2012) Cryopreservation of animal genetic resources. *FAO Animal Production And Health Guidelines*, No. 12 Rome.
- Ghasemi M, Farshad A, Hajarian H, Banafshi O, Asadollahi V, & Fathi F. (2018): The effects of sericin on cryopreserved sperm cells and subsequent embryo development in mice. *Int J Reprod Biomed.* 16(6):405-412.p.
- Grigg, G.W. & Hodge, A.J. (1949):Electron microscopic studies of spermatozoa. In: *The morphology of the spermatozoon of the common domestic fowl (Gallus domesticus)*. *Australian J.of Sci.Res., Series B2*: 271-297.p.
- Griveau, J. F., Dumont, E., Renard, P., Callegari, J. P., & Le Lannou, D. (1995). Reactive oxygen species, lipid peroxidation and enzymatic defence systems in human spermatozoa. *Reproduction*, 103(1), 17–26.p.

- Hammerstedt, R. H., & Graham, J. K. (1992). Cryopreservation of poultry sperm: The enigma of glycerol. *Cryobiology*, 29(1), 26–38. p.
- Hoffmann, I. (2005): Research and investment in poultry genetic resources – challenges and options for sustainable use. *World's Poultry Science Journal*, 61 57-70. p.
- Hoffmann, I. (2010): Livestock biodiversity. *Revue Scientifique et Technique (International Office of Epizootics)*, 29(1):73-86. p.
- Howarth, B. (1971). Transport of Spermatozoa in the Reproductive Tract of Turkey Hens. *Poultry Science*, 50(1), 84–89. p.
- http 1 FAO. <https://www.fao.org/dad-is/en/> (2022 szeptember)
- http 2 Fogolyszínű magyar tyúk. https://mad-hatter.it.unideb.hu/portal/displayDocument/Szervezeti%20t%C3%A1rak/AKIT/Dokumentumt%C3%A1r/DTTI/Fajt%C3%A1ink_DTTI/Fogolysz%C3%ADn%C5%B1%20magyar%20ty%C3%BAk.pdf (2022 szeptember)
- http 3 Génmegőrzés. <https://dtk.tankonyvtar.hu/xmlui/bitstream/handle/123456789/8824/14-Genbankok.pdf?sequence=14&isAllowed=y> (2022 szeptember)
- http 4 Természetvédelem. <https://termeszetvedelem.hu/nemzeti-biodiverzitas-es-genmegorzesi-kozpont/> (2022 szeptember)
- http 5 CBS-Product monograph: <https://www.cryobiosystem.com/wp-content/uploads/2021/06/CBS-Product-Monograph-MAJ2021.pdf> (2022 szeptember)
- http 6 Krioprezerváció. https://www.fao.org/fileadmin/user_upload/animal_genetics/docs/CG_RFA-18-21-10_2_Inf1_forPDF.pdf (2022 szeptember)
- Hübner, R. und Schramm, G.P. (1988): Untersuchungen über die kryoprotektive Eignung von Äthylenglykol und Dimethylacetamid zur Tiefgefrierkonservierung von Hahnensperma. *Monatshefte für Veterinarmedizin*, 43 (8) 279-282. p.
- Ibrahim, S. E., Alzawqari, M. H., Eid, Y. Z., Zommara, M., Hassan, A. M., & Dawood, M. A. O. (2021): Comparing the Influences of Selenium Nanospheres, Sodium Selenite, and Biological Selenium on the Growth Performance, Blood Biochemistry, and Antioxidative Capacity of Growing Turkey Pullets. *Biological Trace Element Research*. doi:10.1007/s12011-021-02894-w
- Isachenko E, Isachenko V, Katkov II et al. 2003 Vitri fication of mammalian spermatozoa in the absence of cryoprotectants: from past partial diffi culties to present success. *Reproductive BioMedicine Online* 6, 191–200. p.
- Jones, R. (1998): Plasma membrane structure and remodelling during sperm maturation in the epididymis. *Journal of reproduction and fertility. Supplement*, 53:73-84. p.

- Jones, R., & Mann, T. (1973): Lipid Peroxidation in Spermatozoa. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 184(1074), 103–107. p.
- Kato, N., Sato, S., Yemanaka, A., Yamada, H., Fuwa, N., & Nomura, M. (1998): Silk Protein, Sericin, Inhibits Lipid Peroxidation and Tyrosinase Activity. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 62(1), 145–147. p.
- Kato, Y., Sasaki, M., Yamada, H., & Terada, S. (2005). Development of a novel serum-free freezing medium for mammalian cells using the silk protein sericin. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 42(2), 183.p.
- Khan, R. U. (2011): Antioxidants and poultry semen quality. *World's Poultry Science Journal*, 67(02), 297–308. p.
- Kim, J., & Parthasarathy, S. (1998). Oxidation and the Spermatozoa. *Seminars in Reproductive Medicine*, 16(04), 235–339. p.
- Kowalczyk A. (2022) The Role of the Natural Antioxidant Mechanism in Sperm Cells. *Reprod Sci*. 29(5):1387-1394.p.
- Pranay Kumar, K., Swathi, B. & Shanmugam M. (2019): Effect of L-Glycine and L-Carnitine on post-thaw semen parameters, fertility and hatchability of cryopreserved chicken semen. *Slovak Journal of Animal Science*, 52, 1-8.p.
- Kundu, S. C., Dash, B. C., Dash, R., & Kaplan, D. L. (2008): Natural protective glue protein, sericin bioengineered by silkworms: Potential for biomedical and biotechnological applications. *Progress in Polymer Science*, 33(10), 998–1012.p.
- Krohn, J., Fischer, D., Schneider, H., Failing, K., Lierz, M., Ehling, C., & Wehrend, A. (2019). Modification and Clinical Application of the Inner Perivitelline Membrane Test in Different Avian Species. *Veterinary Sciences*, 6(2), 39.p-
- Kwon, S., Hess, RA, Bunick, D, Kirby, JD & Bahr JM (1997): Estrogen Receptors Are Present in the Epididymis of the Rooster. *J. Sndrol.*, 18, 378-384. p.
- Lake, P.E. (1968): Observation of freezing fowl spermatozoa in liquid nitrogen. *Proc. 14th World Poultry Congress*, 6-12 September 1968, Madrid, Spain. 279–282. p.
- 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.
- Lawrence R.A, Burk R.F. (1978): Species, tissue and sub-cellular distribution of non-Se-dependent glutathione peroxidase activity. *J. Nutr*; 198:211–5.
- 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(1-4), 45–53. p.

- Li, Y., Zhou, L., Lv, M., Ge, P., Liu, Y., & Zhou, D. (2019). Vitrification and conventional freezing methods in sperm cryopreservation: A systematic review and meta-analysis. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*, 233, 84–92.p.
- Lin, M., & Jones, R. C. (1990). Spatial arrangement of the stages of the cycle of the seminiferous epithelium in the Japanese quail, *Coturnix coturnix japonica*. *Reproduction*, 90(2), 361–367. p.
- Lin, M., Jones, R. C., & Blackshaw, A. W. (1990). The cycle of the seminiferous epithelium in the Japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*) and estimation of its duration. *Reproduction*, 88(2), 481–490. p.
- Liu, J., Robertson, M.C., Cheng, K.M. & Silversides, F.G. (2013) Chimeric plumage coloration produced by ovarian transplantation in chickens. *Poultry Science*, 92 1073-1076. p.
- Luyet, B.J. and Hodapp, E.L. (1938) Revival of Frog's Spermatozoa Vitrified in Liquid Air. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 39, 433-434.p.
- Mandal, R., Badyakar, D., & Chakrabarty, J. (2014). Role of Membrane Lipid Fatty Acids in Sperm Cryopreservation. *Advances in Andrology*, 2014, 1–9. p.
- Mannella, M.R.T. & Jones, R. (1980) Properties of spermatozoal superoxide dismutase and lack of involvement of superoxides in metalion-catalysed lipid peroxidation reactions in semen. *Biochem J.* 191:289–97.p.
- Marczell I. (2015): Az oxidatív stressz szerepe az oncogenezisben. In: Blázovics A., Mézes M. & Róth E. (szerk.): *Oxidatív stressz és betegségek*. Szent István Egyetemi Kiadó Nonprofit Kft., Gödöllő, 244 p., 200-209. p.
- McDaniel CD, Hannah JL, Parker HM, Smith TW, Schultz CD, Zumwalt CD. (1998): Use of a sperm analyzer for evaluating broiler breeder males. 1. Effects of altering sperm quality and quantity on the sperm motility index. *Poult Sci.* 77(6):888-93.p.
- Michalski W. (1992): Resolution of three forms of superoxide dismutase by immobilised metal affinity chromatography. *J Chromatogr B.* 576:340–5.p.
- Min, Y., Sun, T., Niu, Z., & Liu, F. (2016): Vitamin C and vitamin E supplementation alleviates oxidative stress induced by dexamethasone and improves fertility of breeder roosters. *Animal Reproduction Science*, 171, 1–6.p.
- Mizushima, S. (2017) Fertilization 2: Polyspermic Fertilization. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 1001 105-123. p.
- Molisch, H. (1897) *Untersuchungen über das Erfrieren der Pflanzen*. Gustav Fischer Verlag, Jena, 73.p.

- 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.
- Morton, B. E., Sagadraca, R., & Fraser, C. (1978). Sperm Motility within the Mammalian Epididymis: Species Variation and Correlation with Free Calcium Levels in Epididymal Plasma*. *Fertility and Sterility*, 29(6), 695–698. p.
- Moussa, Z., Judeh, Z.M.A., & Ahmed, S.A. (2019): Nonenzymatic exogenous and endogenous antioxidants, *Free Radical Medicine and Biology*, DOI: 10.5772/intechopen.87778
- Matsuo, M. & Kaneko, T.: The chemistry of reactive oxygen species and related free radicals. In: Radák Zs. (szerk.): *Free Radicals in Exercise and Aging. Human Kinetics*. 1, 1-34. p.
- Nasirabadi, H.M., Shirazi A, Kadivar A, Shams-Esfandabadi N, Mohebbi A, Ahmadi E. (2019): Sericin Ameliorates the Capacitation State and Chromatin Integrity of Frozen-Thawed Stallion Spermatozoa by Reducing Oxidative Stress. *Avicenna J Med Biotechnol.*;11(3):245-252.p.
- Nixon, B., Ewen, K. A., Krivanek, K. M., Clulow, J., Kidd, G., Ecroyd, H., & Jones, R. C. (2013). Post-testicular sperm maturation and identification of an epididymal protein in the Japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*). *Reproduction*, 147(3), 265–277. p.
- Nockels, C.F. (1984): Effects of ascorbic acid on chicken metabolism, in: Mino, M., Nakamura, N., Diplock, A. & Moustgaard, J. Ed: *Ascorbic acid in domestic animals*, Royal Danish Agri. Soc., Copenhagen.
- Noirault, J., Brillard, J.-P., & Bakst, M. R. (2006): Spermatogenesis in the turkey (*Meleagris gallopavo*): Quantitative approach in immature and adult males subjected to various photoperiods. *Theriogenology*, 65(4), 845–859. p.
- Nowaczewski, S., & Kontecka, H. (2011): Effect of dietary vitamin C supplement on reproductive performance of aviary pheasants. *Czech Journal of Animal Science*, 50(No. 5), 208–212.p.
- Ohnishi, K., Murakami, M., Morikawa, M., & Yamaguchi, A. (2011): Effect of the silk protein sericin on cryopreserved rat islets. *Journal of Hepato-Biliary-Pancreatic Sciences*, 19(4), 354–360. p.
- Oldenbroek, K. (2007): Utilisation and conservation of farm animal genetic resources. Wageningen Academic Publishers, Wageningen, 229. p.
- Palasz, A. T. & Mapletoft, R. J. (1996) Cryopreservation of mammalian embryos and oocytes: Recent advances. *Biotechnology Advances*, 14(2), 127–149. p.
- Parks, J. E., & Graham, J. K. (1992) Effects of cryopreservation procedures on sperm membranes. *Theriogenology*, 38(2), 209–222.p.

- Partyka, A. & Nizański W. (2021): Supplementatio of avian semen extenders with antioxidants to improve semen quality – Is it effective strategy? *Antioxidants*, 10, 1927. p.
- Partyka, A., Rodak, O., Bajzert, J., Kochan, J., & Nizański, W. (2017). The Effect of L-Carnitine, Hypotaurine, and Taurine Supplementation on the Quality of Cryopreserved Chicken Semen. *BioMed Research International*, 2017, 1–8.p.
- Péczely, Péter (2013): *Madár szaporodásbiológia*. Agroiinform Kiadó, Budapest. 351.p.
- Pegg, D. E. (2014). Principles of Cryopreservation. *Methods in Molecular Biology*, 3–19.p.
- Phillips PH & Lardy HA. (1940): A yolk-buffer pabulum for the preservation of bull semen. *J Dairy Sci.* 23:399–404.p.
- Polge, C., Smith, A. U., & Parkes, A. S. (1949): Revival of Spermatozoa after Vitriification and Dehydration at Low Temperatures. *Nature*, 164(4172), 666–666.p.
- Ricker, J. V., Linfor, J. J., Delfino, W. J., Kysar, P., Scholtz, E. L., Tablin, F., ... Meyers, S. A. (2006). Equine Sperm Membrane Phase Behavior: The Effects of Lipid-Based Cryoprotectants1. *Biology of Reproduction*, 74(2), 359–365. p.
- Safa, S., Moghaddam, G., Jozani, R. J., Daghigh Kia, H., & Janmohammadi, H. (2016): Effect of vitamin E and selenium nanoparticles on post-thaw variables and oxidative status of rooster semen. *Animal Reproduction Science*, 174, 100–106.p.
- Santiago-Moreno, J., Castaño, C., Toledano-Díaz, A., Coloma, M. A., López-Sebastián, A., Prieto, M. T., & Campo, J. L. (2012). Cryoprotective and contraceptive properties of egg yolk as an additive in rooster sperm diluents. *Cryobiology*, 65(3), 230–234. p.
- Santiago-Moreno, J., Estes, M., Villaverde-Morcillo, S., Toledano-Díaz, A., Castaño, C., Velázquez, R., ... Martínez, J. (2016). Recent advances in bird sperm morphometric analysis, and its role in male gamete characterization and reproduction technologies. *Asian Journal of Andrology*, 18, 882-888. p.
- 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 NMethylacetamide as a Cryoprotective Agent. *Journal of Poultry Science*, 47 297-301. p.
- Sexton, T.J. (1980): Optimal freezing rate for cooling chicken semen from +5°C to -196°C. *Poultry Science*, 59 2765-2770. p
- Shaffner, C.S., Henderson, E.W., Card, C.G. (1941) Viability of spermatozoa of the chicken under various environmental conditions. *Poult. Sci.* 20: 259-265.p.
- Sies, H.: *Oxidative stress*, Academic Press, London, 1985.

- Song, Y. and Silversides, F.G. (2006): The technique of orthotopic ovarian transplantation in the chicken. *Poultry Science*, 85 1104-1106. p.
- Sonseeda, P., Somtao, S., Laophaiboon, B., Duangjinda, M. & Vongpralub, T., (2015) Effects of Sericin Supplementation on the Sperm Survival of Cooled Stored Chicken Semen. *KHON KAEN AGR. J.* 43(2).
- Spallanzani, M. (1776): *Opuscles de Physique Animale et Vegetale*.
- Surai P.F., Cerolini S., Wishart G.J., Speake B.K., Noble R.C. & Sparks N.H.C. (1998a) Lipid and antioxidant composition of chicken semen and its susceptibility to peroxidation. *Avian Poult. Biol. Rev.* 9:11–23.p.
- Surai, P., Kostjuk, I., Wishart, G., Macpherson, A., Speake, B., Noble, R., ... Kutz, E. (1998b). Effect of vitamin E and selenium supplementation of cockerel diets on glutathione peroxidase activity and lipid peroxidation susceptibility in sperm, testes, and liver. *Biological Trace Element Research*, 64(1-3), 119–132.p.
- Surai, P. F., Kutz, E., Wishart, G. J., Noble, R. C., & Speake, B. K. (1997). The relationship between the dietary provision of -tocopherol and the concentration of this vitamin in the semen of chicken: effects on lipid composition and susceptibility to peroxidation. *Reproduction*, 110(1), 47–51.p.
- Szalay I.: A fogolyszínű magyar tyúk tenyésztési programja. http://www.mgegodollo.hu/WEBSET_DOWNLOADS/526/A%20fogolysz%C3%ADn%C5%B1%20magyar%20ty%C3%BAk_%C3%BAj%20teny%C3%A9szt%C3%A9si%20program_MGE_2009.pdf (2022. október)
- Szalay I. (2015): Régi magyar baromfifajták a XXI. században. Mezőgazda Kiadó, Budapest, 158 p.
- Szalay I. (2017): Génbanki kutatások régi haszonállataink védelmében. Mezőgazda Lap- és Könyvkiadó, Budapest, 214 p.
- Szalay I. & Koppány G. (2017) Haszinállataink *in vivo* fajtavédelmi rendszere, a génbanki állományok kialakításának hagyományos tenyésztési módszerei. In: Szalay I. (szerk.): Génbanki kutatások régi haszonállataink védelmében. Mezőgazda Lap- és Könyvkiadó, Budapest, 214 p. 13-34. p.
- Tabatabaei, S., & Aghaei, A. (2011): Effect of l-carnitine on sperm quality during liquid storage of chicken semen. *Comparative Clinical Pathology*, 21(5), 711–717.p.
- Tajima, A. (2002): Production of germ-line chimeras and their application in domestic chicken. *Avian and poultry Biology Reviews*, 13 15-30. p.

- 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.
- Thélie, A., Bailliard, A., Seigneurin, F., Zerjal, T., Boichard, M. & Blesbois, E. (2019): Chicken semen cryopreservation and use for the restoration of rare genetic resources. Poultry Science, 98(1): 447-455.p.
- Tixier-Boichard, M., Bed'hom, B. & Rognon, X. (2011): Chicken domestication: from archeology to genomics. Comptes Rendus: Biologies, 334(3):197-204p.
- Tselutin, K., Narubina, L., Mavrodina, D., Tur, B. (1995): Cryopreservation of poultry semen. British Poultry Science, 36 805-811. p.
- Vajta, G. (2000): Vitrification of the oocytes and embryos of domestic animals. Animal Reproduction Science, 60-61 357-364. p.
- Vajta, G., & Nagy, Z. P. (2006). Are programmable freezers still needed in the embryo laboratory? Review on vitrification. Reproductive BioMedicine Online, 12(6), 779–796. p.
- Van Voorst, A., & Leenstra, F. R. (1995). Fertility Rate of Daily Collected and Cryopreserved Fowl Semen. Poultry Science, 74(1), 136–140.p.
- Váradí É. (2016): Hímivarsejtek és korai ivarszerv-szövetek mélyhűtéses tartósításának fejlesztése baromfifajokban génmegőrzés céljából. Doktori (PhD) értekezés, SZIE, Gödöllő, 106 p.
- Váradí É., Drobnyák, Á., Végi, B., Liptói, K., Kiss, C., & Barna, J. (2019). Cryopreservation of gander semen in cryovials – Comparative study. Acta Veterinaria Hungarica, 67(2), 246–255. p.
- Végi B., Váradí É. & Barna J. (2017a) Az ondósejtek hosszú távú tartósítása, a hím ivari anyag megőrzése. In: Szalay I. (szerk.): Génbanki kutatások régi használlataink védelmében. Mezőgazda Lap- és Könyvkiadó, Budapest, 214 p. 102-112. p.
- Végi B., Váradí É. & Barna J. (2017b) Génmegőrzés a hím szaporítóanyag hosszú távú tárolásával. In: Szalay I. (szerk.): Génbanki kutatások régi használlataink védelmében. Mezőgazda Lap- és Könyvkiadó, Budapest, 214 p. 46-59. p.
- Whaley, D., Damyar, K., Witek, R. P., Mendoza, A., Alexander, M., & Lakey, J. R. (2021). Cryopreservation: An Overview of Principles and Cell-Specific Considerations. Cell Transplantation, 30 p.
- Williams, D. D. (1958). A histological study of the effects of subnormal temperature on the testis of the fowl. The Anatomical Record, 130(2), 225–241. p.

- Wishart, G.J. (1997) Quantitative aspects of sperm:egg interaction in chickens and turkeys. *Animal Reproduction Science*, 48 81-92. p.
- Woelders H. (2021): Cryopreservation of Avian Semen. *Methods Mol Biol*. 2180:379-399.p.
- Woelders, H., Zuidberg, C. A., & Hiemstra, S. J. (2006). *Animal Genetic Resources Conservation in the Netherlands and Europe: Poultry Perspective*. *Poultry Science*, 85(2), 216–222. p.
- Yangngam, Y., Chapanya, S., Vongpralub, T., Boonkum, W. & Chankitisakul1, V. (2021): Effect of semen extender supplementation with sericin on post-thaw dairy bull sperm quality and lipid peroxidation. *Czech Journal of Animal Science*, 66(1): 13–20.p.

7. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Ezúton szeretnék köszönetet mondani mindazoknak, akik segítségemre voltak munkám elkészítésében, és ezzel hozzájárultak egyéni fejlődésemhez.

Elsősorban hálával tartozom konzulenseimnek **Dr. Végi Barbara** tudományos főmunkatársnak és **Dr. Egerszegi István** egyetemi docensnek, akik szakmai ismereteim megszerzéséhez leginkább hozzájárultak, akikhez kérdéseimmel fordulhattam, és akik ösztönzőleg hatottak rám.

Köszönettel tartozom **Dr. Drobnyák Árpád** tudományos főmunkatársnak, aki jó tanácsokkal és aktív segítséggel támogatta munkámat.

Köszönöm a **Nemzeti Biodiverzitás és Génmegőrzési Központ, Haszonállat-génmegőrzési Intézet, Génmegőrzés-tudományi és Kisállattenyésztési Osztályának** és annak vezetőjének **Dr. Liptói Krisztinának**, hogy lehetővé tették a kísérlet elvégzését.

Köszönet illeti az **In vitro Génmegőrzési és Szaporodásbiológiai Laboratórium** fejlesztőmérnökeit **Szabó Zsuzsanna Mónikát** és **Török Évát**, akik a kísérletek megvalósításában segítettek.

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

A vizsgálatokat A Kárpát-medencei őshonos haszonállatfajok, -fajták és -ökotípusok XXI. századi génbanki stratégiájának tudományos megalapozása és fejlesztése GENNET_21(VEKOP_2.3.2-16-2016-00012) pályázat támogatásával végeztük.