

ÚJSZERŰ ONDÓVÉTELI TECHNIKA KIDOLGOZÁSA, SPERMATOLÓGIAI PARAMÉTEREK- ÉS HORMONVIZSGÁLATOK HÍM CSINCILLÁKBAN

BABARCZI B¹, FERENCZINÉ SZÓKE ZS², DROBNYÁK Á³, BÍRÓ E³, BARNA J³, KUSTOS K¹, HEINCINGER M¹, VÉGI B.³

¹Lab-Nyúl Kft. 2100 Gödöllő, Kossuth Lajos u. 27. 3/10

²NAIK-MBK, 2100 Gödöllő, Szentgyörgyi Albert u. 3.

³Haszonállat- génmegőrzési Központ, 2100 Gödöllő, Isaszegi út 200.

E-mail: vegi.barbara@hagk.hu

ABSTRACT- Elaboration of novel semen collection technique, examinations on semen qualities and hormone status of male chinchilla

There is just some of the information available on the chinchilla reproductive properties. Nowadays, the most common semen collecting method in chinchilla is the electro-ejaculation. In the present study the effects of semen collection by manual stimulation was tested on the changes of stress hormone level of the animals, and the acclimatization period for sperm collection, moreover the possible changes of the semen parameters. Sperm and urine samples were collected once a week during 13 weeks from both trained (experiment 1) and younger, untrained (experiment 2) males. During the examinations the sperm motility and concentration were determined with CASA, the ratio of live, intact; live, abnormal and dead spermatozoa with aniline blue-eosin staining method. The urine corticosterone and testosterone levels were detected with ELISA. Semen collection with massage method did not have a stressful effect either on the already trained chinchilla males, or on the untrained ones, since elevated corticosterone levels were found only after the first attempts in both experiments. The success or unsuccess of the tested semen collection process does not depend on the stress caused by the procedure. However, the ratio of successful sperm collection has to improve by further refining of the technique, -moreover by the use of a conscious selection work. Among the qualities of semen samples significant individual differences were found, the reasons for this need further investigation.

Keywords: chinchilla sperm, stress, sperm collection

BEVEZETÉS

A csincsilla (*Chinchilla lanigera*) tenyésztés fontosságát két oldalról is megközelíthetjük. Egyrészt természetes élőhelyén veszélyeztetett állatfaj (IUCN Red List of Threatened Species; <http://www.iucnredlist.org>), másrészt gazdasági szempontból jelentős prémés állat. A reprodukciós tulajdonságok ismerete mindkét szempontból fontos, azonban erről viszonylag kevés szakirodalom áll rendelkezésünkre. Dolgozatunkban a hímivarú csincsillák szaporodásbiológiai tulajdonságainak egyes részleteit vizsgáltuk (ondóvétel, spermológiai paraméterek, hormonvizsgálatok). Napjainkban, csincsillában az egyedüli spermavételi módszer az elektromos stimuláció. Azonban bizonyított tény, hogy az állatok számára ez egy fájdalmas és jelentős stresszel járó eljárás (ABRIL-SÁNCHEZ és mtsai, 2019). Munkánk során megpróbáltunk kifejleszteni egy olyan természetes ondóvételi technikát, mellyel az állatjóléti szempontokat is figyelembe véve a trenírozási időszakon túl biztonságosan és hosszútávon, rutinszerűen gyűjthető akár egész évben ondó. Vizsgálni kívántuk, hogy az általunk kifejlesztett manuális ondóvételi eljárás milyen arányban sikeres, mekkora stresszt okoz az állatoknak, mennyi idő alatt szoknak hozzá az ondóvételhez, illetve hogy ez összefüggésbe hozható-e a spermológiai paraméterekkel.

ANYAG ÉS MÓDSZER

1. Állatok és elhelyezésük:

Az állatokat a gyakorlatban is alkalmazott ketrecekben helyeztük el, 12L:12D megvilágítás mellett. Csincilla tenyésztáp, lucerna pogácsa és a víz adagolása *ad libitum* történt. Hetente egyszer csincilláknak kifejlesztett fürdető homokot is helyeztünk a ketrecükbe. Az első kísérletbe 30 db, 1 éves csincilla bakot vontunk, melyektől már 6 hónapja próbáltunk ondót gyűjteni. A második kísérlet során 10 db 10 hónapos bakot alkalmaztunk, melyekkel a vizsgálat során kezdtük a trenírozást.

2. Ondóvétel és ondóminősítés

Az ondóvételhez, digitális manipuláción alapuló masszázst alkalmaztunk, mely áll egyrészt a végbél környékének, másrészt a pénisz teljes hosszának stimulálásából. A spermadonor állatok nem voltak szelektálva sem kezelhetőségre, sem az ondóvételre való reagáló képességükre. Az ondóvétel és az ondóvizsgálat hetente egy alkalommal történt, 13 héten keresztül.

Az ondót a párási dugó, illetve egyéb szennyeződések elkerülése céljából gézlapra vettük, amit 500 µl fiziológiás sóoldatot tartalmazó Eppendorf csőbe áztattunk, majd a gézlapot az ún. „párási dugóval” együtt eltávolítottuk a mintákból.

Az ondósejtek motilitását és koncentrációját számítógépes spermaanalízissel (CASA, Microptic S.L. SCA[®]) vizsgáltuk. Ennek során meghatároztuk a gyorsan (VLCR), közepesen gyorsan (VLCM) előre haladó sejtek, az egy helyben mozgó (VLCN) és a nem mozgó (VLCI) sejtek arányát, valamint az összes motilis sejtarányt. Az élő, ép sejtek; az élő, morfológiailag rendellenes sejtek és az elhalt sejtek arányát anilinkék-eozin (Anilin SIGMA-Aldrich, Eosin Y Merck Hungary) festéssel készült kenetekben határoztuk meg, melynek során 200 sejtet elemeztünk minden kenetben.

3. Hormon vizsgálatok

A kortikoszteron, mint stressz-hormon és a tesztoszteron, mint a legfőbb hím nemi hormon meghatározása non-invazív módszerrel, vizeletből történt, melyet az állatok ketrece alatt elhelyezett egyedi fém tepsikből pipetta segítségével gyűjtöttünk össze 13 héten keresztül, hetente egy alkalommal, mindig azonos időpontban. Az egyes állatokra jellemző kiindulási értékek meghatározásához az ondóvételeket megelőző napon, ugyanabban az időintervallumban, amikor az ondóvétel történt, összegyűjtöttük a vizelet mintákat. Ezt követően az ondóvételek után helyeztük el a tepsiket és két óra alatt összegyűjtött vizelet mintákat gyűjtöttük 1,5 ml-es Eppendorf csőbe. A hormonok kimutatásáig – 70 °C-on tároltuk a mintákat.

A hormon analízisekhez a felolvasztott vizelet mintákat szobahőmérsékleten 5 percig, 1000 rpm fordulatszámra centrifugáltuk, az üledék eltávolítása céljából. A centrifugálás után a felülúszó 25 µl-jét 25X-re hígítottuk a kortikoszteron és 40X-re hígítottuk a tesztoszteron kimutatásához az assay pufferekkel. Majd a gyártó TDS utasításai szerint végeztük el az analíziseket. A kortikoszteront az Arbor Assays DetectX corticosterone enzyme immuno assay kit segítségével határoztuk meg (katalógus szám: K014-H5), míg a tesztoszteronhoz az Arbor Assays DetectX testosterone enzyme immuno assay kitet (katalógus szám: K032-H5) használtuk. Mindkét kit alkalmas a vizeletminták analízisére is.

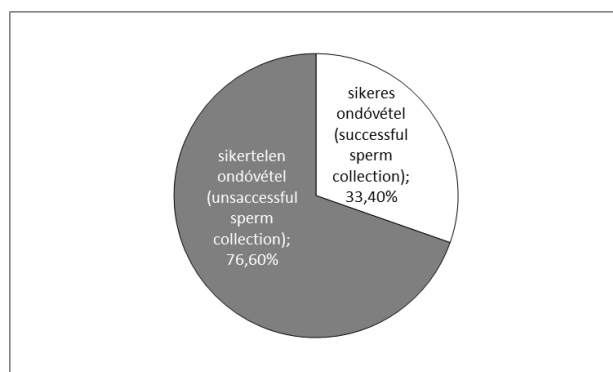
Az adatok statisztikai elemzését a *Statistica 10.0 program* segítségével végeztük el. A százalékban kifejezett és ábrázolt adatok esetén *arcsin transzformációt* követően (HARNOS ÉS REICZIGEL, 2006) végeztük el a statisztikai elemzéseket. Az adatok normalitás vizsgálatának eredményei alapján az adatok nem voltak normál eloszlásúak, ezért nem paraméteres próbákkal

(független minták: Kolmogorov-Smirnov two-sample test, függő minták: Wilcoxon matched pair test) végeztük a szignifikancia vizsgálatokat. A spermológiai paraméterek és a hormon eredmények közötti kapcsolat vizsgálatára regresszió analízist végeztünk.

EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK

1. kísérlet

A sikertelen és a sikeres ondóvételek megoszlását mutatja az *1. ábra*. A sikeres ondóvételek aránya 33,4% volt a vizsgált időszakban, annak ellenére, hogy ezektől a bakoktól már hosszabb ideje próbáltunk ondót gyűjteni.



1. ábra: A sikeres és sikertelen ondóvételek aránya manuális stimulációval

Figure 1: The ratio of successful and unsuccessful sperm collection by manual stimulation

Az *1. táblázatban* látható, hogy a spermium koncentráció átlagos értéke 1.306,89 millió/ml volt, azonban nagyon nagy egyedi eltéréseket tapasztaltunk. A motilitási értékek szintén nagyon széles skálán mozogtak, azonban az is látható, hogy a gyors, előre haladó (VLCR-62,63%) sejtek aránya volt a legmagasabb a motilitási értékek közül, míg a közepes sebességgel mozgó sejtek aránya (VLCM-1,69%) a legalacsonyabb.

1. táblázat: A spermium-koncentráció és a spermium-motilitás értékek alakulása a vizsgált időszakban

Table 1: The data of sperm concentration and motility parameters in the investigated period

	koncentráció (millió/ml) (concentration (10⁶/ml)	össz. motilitás (%) total motility (%)	VLCR (%)	VLCM (%)	VLCN (%)	VLCI (%)
átlag (average)	1306,89	86,47	62,63 ^a	1,69 ^b	22,15 ^c	13,53 ^c
minimum	9,08	25	0	0	0	0,34
maximum	5352	99,67	99,06	22,89	88,01	75

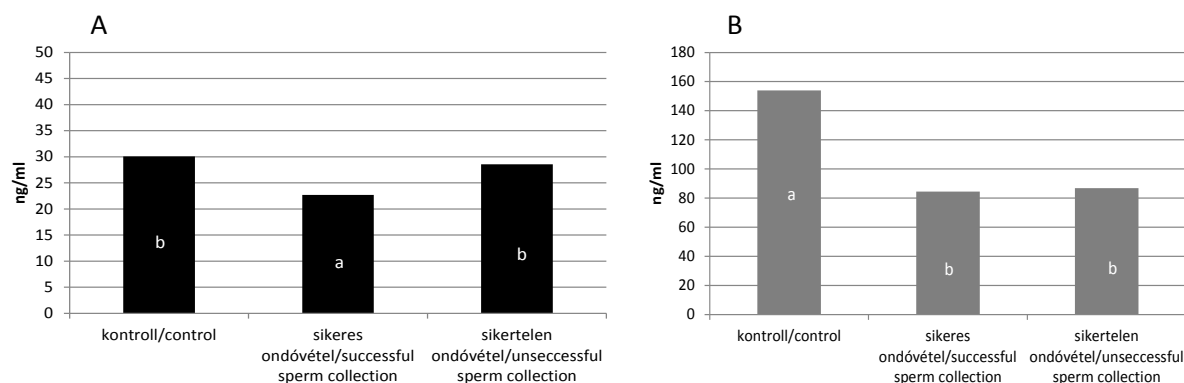
a, b, c: $p \leq 0,05$

Az anilinkék-eozin festett kenetekben az élő, ép sejtek arányának átlaga 80% felett volt, az élő, rendellenes sejtek arányának átlaga 3% körül alakult, míg az elhalt sejtek 13% körül mozogtak (*2. táblázat*). Az eredményekből itt jól látszanak a nagy egyedi eltérések.

2. táblázat: Az anilinkék-eozin festéssel készült kenetek vizsgálatának eredményei
 Table 2: The data of anilinblue-eosin stained smears

	élő, ép sejtek (%) <i>live, intact spermatozoa (%)</i>	élő, morfológiailag rendellenes sejtek (%) <i>live, abnormal spermatozoa (%)</i>	holt sejtek (%) <i>dead spermatozoa (%)</i>
átlag (average)	82,68	3,43	13,89
minimum	53,28	0	3,11
maximum	95	22,34	44,53

A 2. ábra mutatja a vizeletből kimutatott kortikoszteron (A) és tesztoszteron (B) értékeket. Szignifikánsan magasabb stressz hormon szinteket mértünk a kiindulási alapvizsgálatoknál, valamint a sikertelen próbálkozások esetén, míg a legalacsonyabb kortikoszteron értéket a sikeres ondóvételek esetén találtuk. A tesztoszteron szintje a kiindulási, kontroll időpontban volt a legmagasabb, a spermavételek során ez a szint jelentősen csökkent. A sikeres és a sikertelen ondóvételek tesztoszteron értékei között nem volt különbség. A kiindulási értékhez képest lecsökkent tesztoszteron szint a spermatológiai mutatók alakulásában nem tükröződött.

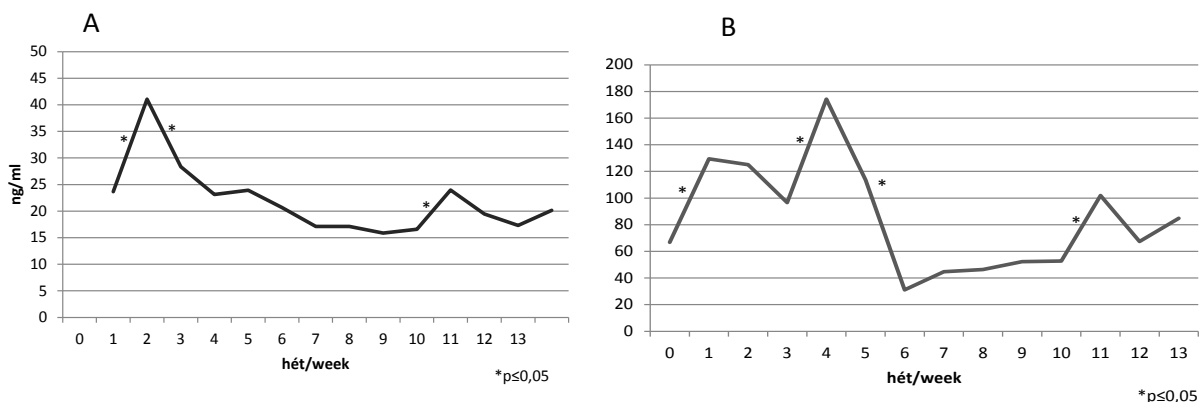


2. ábra. A vizelet kortikoszteron (A) és tesztoszteron (B) értékeinek alakulása a vizsgált időszak átlagában

Figure 2. The main values of corticosterone (A) and testosterone (B) in the urine
 a,b: $p \leq 0,05$

2. kísérlet

A 3. ábra mutatja, hogy a kiindulási szinthez képest az első ondóvételi próbálkozás során megnövekedett a kortikoszteron értéke, de már a második alkalommal csökkent és a továbbiakban is alacsony értékeket mutatott. A 11. ondóvételekor kissé magasabb kortikoszteron szintet tapasztaltunk, amikor más végezte az ondóvételt. Az általunk alkalmazott ondóvételi technika csak az első alkalommal okozott mérhető stresszt az állatoknak. Azonban ebben az időszakban az új bakoktól még nem sikerült ondót gyűjteni, attól függetlenül, hogy maga a kézbe vétel és próbálkozás nem járt jelentős stresszel. A tesztoszteron szint az első négy héten emelkedett, ezután hirtelen lezuhant és a következő 9 héten át alacsonyabb szinten maradt.



3. ábra: A kortikoszteron (A) és tesztoszteron (B) értékek alakulása a fiatal bakoknál az egyes spermavételeket követően

Figure 3. Values of corticosterone (A) and testosterone (B) of younger males following each sperm collection

KÖVETKEZTETÉS

A digitális manipuláción alapuló ondóvételi eljárás a már trenírozott bakoknak (1. kísérlet) nem járt stressz hatással, az új bakcsoportnál (2. kísérlet) is csak az első alkalommal találtunk emelkedett kortikoszteron szintet. Tehát az általunk kidolgozott ondóvételi eljárás sikeressége, vagy sikertelensége nem az eljárás okozta stressz hatáson múlik, azaz állatvédelmi szempontból pozitív az eredménye. Mindkét kísérleti csoportban a kiindulási tesztoszteron értékekhez képest csökkenést tapasztaltunk, ami feltételezhetően a mintavételi időpontban jelentkező extrém nyári meleggel hozható összefüggésbe. Ezt alátámasztotta az első kísérleti csoportban a spermaadási hajlandóság csökkenése is az adott időpontban.

Az irodalmi adatok alapján az általánosan elterjedt elektroejakuláció használatával eltérő, de viszonylag jó (60% körüli) az ondóvétel sikeressége (BUSSO és mtsai, 2005), míg a manuális stimuláció csak átlagosan 34% volt, nagy szórásértékekkel. Azonban az 'animal welfare' szempontokat is figyelembe véve, a technika további finomításával és egy tudatos szelekciós munkával ez az arány feltételezhetően jelentősen javítható lesz. A korábbi szelekciós munka a kiváló prémminőségre irányult, de a továbbiakban szükséges az ondóadási hajlandóság mellett a kiváló spermaminőségre is szelektálni.

A csincsilla spermatológiai paramétereiről kevés irodalmi adat áll rendelkezésünkre és azok is nagy szórást mutatnak (BARNABE és mtsai, 1994; BUSSO és mtsai, 2004; PONZIO és mtsai, 2011; DOMINCHIN és mtsai, 2014). Az általunk vizsgált ondóminták paramétereit között szintén jelentős egyedi eltéréseket tapasztaltunk, az okok felderítése további vizsgálatokat igényel.

IRODALOMJEGYZÉK

- ABRIL-SÁNCHEZ, S., FREITAS-DE-MELO, A., GIRIBONI, J., SANTAIGO-MORENO, J., UNGERFELD, R. 2019. Sperm collection by electroejaculation in small ruminants: A review on welfare problems and alternative techniques. *Animal Reproduction Science*, <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2019.03.023>
- BARNABE, V.H., DUARTE, M., BARNABE, R.C., VISINTIN, J.A., DE FERITAS, L. 1994. Electroejaculation and seminal characteristic in chinchilla (*Chinchilla laniger*). *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*. 31:295-7.
- BUSSO, J.M., PONZIO, M.F., FIOLE DE CUENO, M., RUIZ, R.D. 2005. Reproduction in chinchilla (*Chinchilla lanigera*): Current status of environmental control of gonadal activity and advances in reproductive techniques. *Theriogenology* 78 (2012) pp. 1-11.
- BUSSO, J.M., PONZIO, M.F., DE CUENO, M.F., RUIZ, R.D. 2005. Year-round testicular volume and semen quality evaluation in captive Chinchilla lanigera. *Animal Reproduction Science* 90:127-34.
- DOMINICHIN, M.F., BIANCONI, S., PONZIO, M.F., FIOLE DE CUENO, M.F., RUIZ, R.D., BUSO, J.M. 2014. Seasonal evaluation of urinary androgen metabolites and semen quality in domestic long-tailed chinchilla (*Chinchilla lanigera*) under natural photoperiod. *Animal Reproduction Science* 145:99-104.
- HARNOS, A., REICZIGEL, J. 2006. *Biostatisztika és kísérlettervezés*. p:14. www.univet.hu/users/zslang/phd/kis-terv--elemszam--transzform.pdf
- PONZIO, M.F., ROUSSY-OTERO, G.N., RUIZ, G.M., FIOLE DE CUENO, M.H., 2011. Seminal quality and neutral alpha-glucosidase activity after sequential electroejaculation of chinchilla (*Ch. laniger*). *Animal Reproduction Science*. 126:229-233