

**Állatorvostudományi Egyetem**

**Szülészeti Tanszék és Haszonállat-gyógyászati Klinika**

Asszisztált reprodukciós technológia alkalmazása a nyúltenyésztésben

Application of assisted reproductive technology in rabbit breeding

Készítette: Dukai Bálint

Témavezető: Dr. Horváth András, egyetemi docens, PhD

Szülészeti Tanszék és Haszonállat-gyógyászati Klinika

2023

## **Absztrakt**

A nyúlhús rendkívül egészséges és értékes összetevőket tartalmaz, ezért az egészséges táplálkozás részeként kiemelt helyet foglalhatna el az étrendben, azonban a hazai nyúlfogyasztás jelenleg rendkívül kis mértékű és a megtermelt nyúl és nyúlhús szinte egésze exportra kerül. Ezen termékek tömeges előállítására érdekében a nyúltenyésztésben a szaporulat létrehozásához asszisztált reprodukciós technológiákat alkalmaznak. Ezen technikák két fő csoportja az embrió-reprodukciós technikák és a mesterséges termékenyítés, mely spermavételből és a sperma vizsgálatából, hígításából, tárolásából; valamint magából a termékenyítésből, azaz inszeminálásból áll. A nyúltenyésztésben a mesterséges termékenyítést alkalmazzák, melynek sikerességét vemhességvizsgálattal ellenőrzik.

Szakdolgozatom célja az volt, hogy egy hazai nyúltelep termékenyítési és termelési adatainak leíró- és összehasonlító statisztikai elemzésével a feltételezett nullhipotéziseket alátámasszam vagy megcáfoljam.

Ehhez a MATE Tangazdaság Nonprofit Kft. kaposvári nyúltelepének 2000-2010 közti adatait használtam, melyek táblázatba rendezéséhez és statisztikai elemzéséhez a Microsoft Excel programot használtam.

A leíró statisztika eredményei évenkénti bontásban tartalmazzák az egyes vizsgált paraméterek alakulását. Az összehasonlító statisztikai korrelációvizsgálatok eredményei a nullhipotézisek többségét cáfolták. Az eredmények alapján megállapítható, hogy az anyák öregedésével arányosan csökken a vemhesülési arányuk és a magzatnevelő képességük, valamint a megszületett utódok száma és súlya is arányosan csökken, illetve a nagyobb alomlétszám nagyobb elhullási aránnyal jár.

## **Abstract in English**

Rabbit meat contains extremely healthy and valuable ingredients and could therefore be a key part of a healthy diet, but domestic consumption of rabbit is currently very low and almost all rabbit and rabbit meat produced is exported. In order to mass produce these products, rabbit breeding uses assisted reproduction techniques to produce offspring. The two main groups of these techniques are embryo reproduction techniques and artificial insemination, which consists of semen collection and testing, dilution and storage of the semen; and insemination itself, i.e. insemination. In rabbit breeding, artificial insemination is used, the success of which is monitored by a pregnancy test.

The aim of my thesis was to support or refute the null hypotheses by descriptive and comparative statistical analysis of the insemination and production data of a domestic rabbit farm.

For this purpose, I used the data of the rabbit farm of MATE Tangazdaság Nonprofit Kft. in Kaposvár between 2000 and 2010, which I tabulated and statistically analysed using Microsoft Excel.

The results of the descriptive statistics show the evolution of the parameters under study, broken down by year. The results of the comparative statistical correlation tests disproved most of the null hypotheses. The results indicate that as mothers age, their pregnancy rate and their ability to produce offspring decrease proportionally, the number and weight of offspring born decreases proportionally, and that a higher number of litters is associated with a higher mortality rate.

## Tartalomjegyzék

Absztrakt .....	2
Abstract in English .....	3
1. Rövidítések jegyzéke .....	5
2. Bevezetés .....	7
3. Szakirodalmi áttekintés .....	7
3.1. A nyúltenyésztés aktuális helyzete Magyarországon .....	7
3.2. A nyúlhús és nyúlhús fogyasztási szokások.....	8
3.3. A házinyúl szaporodásbiológiai jellemzői .....	8
3.4. Az asszisztált reprodukciós technológiák jelentősége .....	10
3.5. Asszisztált reprodukciós technológiák.....	10
3.6. A nyúltenyésztésben használt asszisztált reprodukciós technológiák.....	12
3.6.1. Embrió-reprodukciós technikák .....	13
3.6.2. Mesterséges termékenyítés (AI).....	15
3.6.2.1. Spermával kapcsolatos műveletek.....	17
3.6.2.2. Inszeminálás és a vemhesség megállapítása.....	22
4. Célkitűzés.....	23
5. Anyag és módszer .....	23
5.1. A telep mesterséges termékenyítési protokollja (spermával kapcsolatos műveletek, inszeminálás).....	24
5.2. Fajták.....	25
5.3. Vemhességvizsgálat és a született utódok hasznosítása .....	25
5.4. Statisztika .....	26
6. Eredmények .....	26
6.1. Leíró statisztika.....	26
6.2. Összehasonlító statisztika .....	36
7. Következtetések .....	45
8. Összefoglalás .....	48
9. Irodalomjegyzék.....	49
10. Köszönetnyilvánítás .....	53

## 1. Rövidítések jegyzéke

<b>μl</b>	mikroliter
<b>μm</b>	mikrométer
<b>AFP</b>	antifreeze proteins/ fagyálló fehérjék
<b>AI</b>	artificial insemination/mesterséges termékenyítés
<b>BSA</b>	bovine serum albumin/szarvasmarha szérum albumin
<b>C.A.S.A</b>	Computer Assisted Semen Analysis/számítógépes spermaelemzés
<b>CLA</b>	konjugált linolsav
<b>CO<sub>2</sub></b>	szén-dioxid
<b>CVD</b>	cardiovascular diseases/kardiovaszkuláris betegségek
<b>C<sub>xy</sub></b>	kovariancia
<b>DHA</b>	dokozahexaénsav
<b>DMSO</b>	dimetil-szulfoxid
<b>DNS</b>	dezoxiribonukleinsav
<b>DPBS</b>	Dulbecco-féle foszfát-pufferolt sóoldat
<b>EC</b>	extracelluláris
<b>eCG</b>	equine chorion gonadotropin
<b>EDTA</b>	etilén-diamin-tetraecetsav
<b>ELISA</b>	enzyme-linked immunosorbent assay
<b>EPA</b>	eikozapentaénsav
<b>ET</b>	embrió transzfer
<b>FBS</b>	fetal bovine serum/szarvasmarha magzati szérum
<b>FSH</b>	folliculus stimuláló hormon
<b>GnRH</b>	gonadotropin-releasing hormon
<b>IC</b>	intracelluláris
<b>ICSI</b>	intracytoplasmic sperm injection/intracitoplazmatikus spermium injekció
<b>IM</b>	intramuscularis
<b>IVF</b>	in vitro fertilizáció
<b>LH</b>	luteinizáló hormon
<b>MT<sub>95%,r</sub></b>	95%-os megbízhatósági tartomány
<b>°C</b>	Celsius-fok
<b>OPU</b>	oocyte-pickup/petesejtek kinyerése
<b>OSC</b>	oogonial stem cells/oogoniális őssejtek

<b>pFSH</b>	sertés folliculus stimuláló hormon
<b>PGF2<math>\alpha</math></b>	prostaglandin F-2 $\alpha$
<b>PMSG</b>	pregnant mare serum gonadotropin/ló koriogonadotropin
<b>PVA</b>	polivinil-alkohol
<b>PVC</b>	polivinil-klorid
<b>r</b>	korrelációs koefficiens
<b>rhFSH</b>	rekombináns humán folliculus stimuláló hormon
<b>ROS</b>	reactive oxygen species/reaktív oxigényökök
<b>SCNT</b>	somatic cell nuclear transfer/szomatikus sejtmagátültetés
<b>SD</b>	standard deviation/szórás
<b>SEM</b>	scanning/pásztázó elektronmikroszkóp
<b>SSC</b>	spermatogonial stem cells/spermatogoniális őssejtek
<b>TEM</b>	transzmissziós elektronmikroszkóp
<b>V/V%</b>	térfogatszázalék
<b>W/V%</b>	vegyesszázalék

## **2. Bevezetés**

Szakedolgozatom témájául azért választottam a nyúltenyésztésben alkalmazott asszisztált reprodukciós technológiák alkalmazását, mert azt gondolom, hogy a nyúltenyésztésnek és a nyúlhús- valamint nyúltermékek előállításának kisebb szerep jut a hazai élelmiszer-előállítás területén. A megtermelt nyúlhús és nyúltermékek szinte teljes mennyisége exportálásra kerül, a hazai nyúlhús fogyasztás rendkívül kismértékű. Azon belül is főként a mesterséges termékenyítés alkalmazásának vizsgálatát és az alkalmazás eredményeként előállított szaporulat bizonyos paramétereinek leíró és összehasonlító statisztikai elemzését végeztem. Ugyanakkor a nyúlhús rendkívül egészségesnek mondható és sok, az egészséges táplálkozás szempontjából fontos összetevőt tartalmaz. Azt gondolom, hogy a jövőben a nyúlhús fogyasztás növekedni fog, ugyanis az egyre erősödő tudatos táplálkozás és vásárlói szemlélet az egészséges étrendbe beilleszthető termékek, például a nyúlhús irányába fogja terelni a vásárlók figyelmét.

Szakedolgozatomban egy hazai nyúltelep mesterséges termékenyítési protokolljának elemzése és termékenyítési adatainak értékelése, valamint a mesterséges termékenyítés eredményeként a termelési adatok statisztikai elemzésével szeretném az általam feltételezett nullhipotéziseket alátámasztani vagy megcáfolni és összefüggéseket keresni bizonyos termékenyítési és termelési paraméterek között.

## **3. Szakirodalmi áttekintés**

### **3.1. A nyúltenyésztés aktuális helyzete Magyarországon**

Magyarországon a nyúltenyésztés nagy múltra tekint vissza. Míg korábban a szinte kizárólag saját fogyasztásra, a helyi piacon történő értékesítésre termeltek nyulat, ma már a belföldi kereskedelem minimálisnak mondható, a felvásárolt nyúl szinte teljes mennyisége exportálásra kerül. Ennek következményeként tudható be, hogy mind Európában, mind világviszonylatban kiemelkedő helyet foglalunk el a nyúlexport terén.

Fajta tekintetében egy őshonos húsnyúl fajtánk van, a magyar óriás, de számos hibrid is megtalálható, úgymint a Hycole, a Hyplus medium, Hy-19 capitale.

A fajta és a hibrid kiválasztásánál elsődleges szempontként a termelőképeséget, a termelési intenzitás fokát, a termelési feltételeket, a gazdaságosságot kell figyelembe venni. Mind a fajtatiszta, mind a hibrid nyulak tartásának megvan a létjogosultsága, azonban a magyarországi adottságok és feltételek főleg a fajtatiszta és egyszerűbb keresztezési kombinációk tenyésztésének kedveznek.

Korábban, főleg a II. világháborút megelőzően nagy számban működtek angóranyúl telepek, azonban a háborút követően a szervezett szőrmebegyűjtés csökkent, a tenyésztési kedv jelentősen megcsappant, így ezen szőrmetermelő fajta tenyésztése minimálisra csökkent.

A tartás egyaránt történik kis telepeken, valamint vállalkozó méretű és nagyobb telepeken. Utóbbiak többsége főleg átalakított, ritkábban új épületekben folytatja a termelést. A tartástechnológia javításában számos lehetőség rejlik még, ezek közül kiemelendő a légcserre és a klimatizálás fejlesztése, a ketrecek minőségi javítása, alternatív tartási formák kialakítása. [1]

### **3.2. A nyúlhús és nyúlhús fogyasztási szokások**

A házinyúl húsa nagyon jó biológiai tulajdonságokkal rendelkezik. Fehérje- és esszenciális aminosav-tartalma magas, ugyanakkor zsírtartalma alacsony, abban sok többszörösen telítetlen zsírsav található, az Omega-6/Omega-3 zsírsavak aránya is kifejezetten kedvező. Kiemelkedő B12-vitamin forrás, valamint nagymértékben tartalmaz foszfort, káliumot és szelént, nátriumtartalma azonban alacsonynak mondható. Funkcionális élelmiszerként betöltött szerepe azonban a takarmányozás javításával tovább növelhető. Továbbá magas az EPA (eikozapentaénsav), DHA (dokozaheksaénsav), CLA (konjugált linolsav) és E-vitamin tartalma. Ezen tulajdonságaiból kifolyólag a rendszeres nyúlhús fogyasztás fontos bioaktív vegyületek forrása a fogyasztónak, amelyek kulcsszerepet játszanak a CVD (cardiovascular diseases/kardiovaszkuláris betegségek) és más krónikus betegségek megelőzésében. [2,3]

A fent leírt pozitív táplálkozás-élettani hatások ellenére hazánkban a nyúlhús fogyasztás mértéke kifejezetten alacsony, más európai országokétól jelentősen elmarad. Ennek egyik fő oka az export, de szerepet játszhat a nyúlhús ára is, továbbá sokan valószínűleg pszichikai okok miatt idegenkednek a nyúl íztől. [4]

### **3.3. A házinyúl szaporodásbiológiai jellemzői**

A nyúl ivari traktusának anatómiai jellegzetessége az uterus duplex, ami azt jelenti, hogy két, funkcionálisan és morfológiailag teljesen különálló méhszarvval és méhnyakkal rendelkezik, melyek a hüvelybe nyílnak. [43]



A nyúl, akárcsak a macska és a görény, indukált ovulációt mutat és nem rendelkezik szabályos időtartamú és periodikusan ismétlődő ivari ciklussal. A tüszők fejlődése hullámokban történik, petefészkenként 5-10 tüsző növekszik, melyekben 1-1 oocyta fejlődik. Ösztrogéntermelésük 12-14 napig tart, majd ovuláció hiányában a tüszők degenerálódnak, az ösztrogénszint esésével pedig a receptivitás is csökken, majd 4 nap múlva újabb hullám kezdődik. A nőtény általában 17-20 hetes korában válik ivaréretté, általában bármikor elfogadja a bakot. A coitus során a vaginát ellátó idegek ingerlése következtében a hypothalamusban fokozódik a GnRH (gonadotropin-releasing hormon) felszabadulás, melynek hatására a hypophysis elülső lebenyében gonadotropinok mellett FSH (folliculus stimuláló hormon) termelődik, ami a tüszők fejlődését szabályozza, valamint LH (luteinizáló hormon), amely az ovulációt váltja ki. Ezek következtében a bak jelenléte által kiváltott szexuális izgalom és a pázás ovulációt indukál a coitust követően körülbelül 10 órával. Ebből adódóan az ovuláció ideje szinte bármely más fajhoz képest nagyobb pontossággal megjósolható. Ezután a tüszőből corpus luteum alakul ki, amely a progeszterontermelés által gátolja az újabb tüszőnövekedési-hullám megindulását, sikeres megtermékenyítést követően, amely a petevezető ampullájában történik, a vemhesség ideje alatt végig fennmarad. Megtermékenyülés hiányában vagy korai embrióveszteségek esetén a méh luteolitikus hatású PGF<sub>2</sub>- $\alpha$  (prostaglandin-F<sub>2</sub>  $\alpha$ ) termelésébe kezd az ovuláció után 17 nappal, aminek következtében a progeszteronszint csökkenésével új hullám indul meg. [5,15,16,17]

A nyúl petesejtjei nagyobbak (körülbelül 160  $\mu$ m átmérőjűek) és gyorsabban fejlődnek szinte bármely más emlősfajénál. [6] A megtermékenyítést követően a zigóta kifejezetten gyorsan halad keresztül az isthmuson és az uterotubális junkción. Nyulak esetében a fejlődő zigóta a méh üregében foglal helyet és kitölti a lument, ez a centrális implantáció, míg nők esetében behatol az endometrium epithel rétegébe. A nyulak placentája haemochorialis típusú, melynek következtében az anyai immunglobulinok átjutnak a fejlődő magzatba, így biztosítva azoknak szisztémás passzív immunitást. Ez azért is fontos, mert az újszülött nyúl belei viszonylag impermeabilisak a makromolekulák, például az immunglobulinok számára. [5] A nyúlembrió sajátossága, hogy a zona pellucidán kívül egy mucinréteg is körbeveszi, amely a petevezetőn való áthaladás során rakódik rá és kulcsfontosságú szerepe van az embrió fejlődésének terminális szakaszában. [17] Az embriót a zona pellucida és a mucinréteg veszi körül a megtermékenyülést követő 72-96 órában, majd körülbelül ennyi idő után a zona pellucida eltűnik és a blasztociszta méhbe kerülésekor (körülbelül 4,5 nap) a neozona váltja fel, a mucinburkot pedig egy új réteg, a gloiolemma fogja borítani a 6. nap körül. [44]

A vemhesség általában 31-32 napig tart, az anyai felismerés az első trimeszter végén történik meg. Az ellés során a nőtény igyekszik olyan pozíciót felvenni, hogy szájával segíthesse az ellést és megtisztíthassa az újszülötteket a magzati hártyáktól, a placentát általában megeszi. Az alomnagyság jellemzően 4-12, az újszülöttek vakon születnek és körülbelül a 10. napra nyílik ki a szemük. A kölykök naponta egyszer szopnak, a leválasztás természetes körülmények között 8 hetesen történik, de nagyüzemi körülmények között ez már általában 4 hetes korban megtörténik. A fent leírt adottságokból fakadó szaporaság és szelekció következtében a nagy teljesítményű nyulak ideális reprodukciós teljesítménye évi 8 fialás. [5,7,17]

A laktáció során a tej összetétele jelentősen változik. A nyúltej alacsony laktóztartalommal rendelkezik, ami folyamatosan csökken a laktáció előrehaladtával, [8] valamint magas fehérje- és zsírtartalommal bír. [9] A nyúltej – a tehéntejhez hasonlóan – kevés vasat tartalmaz, azonban ez nem okoz gondot, ugyanis az újszülött nyulak nagy vastartalékokkal rendelkeznek, így nem függenek a tej vastartalmától. [10]

### **3.4. Az asszisztált reprodukciós technológiák jelentősége**

A háziállataink szaporodása szinte teljes egészében emberi kontroll alatt áll. Erre már számos különböző technológia áll rendelkezésre, melyek azonban óhatatlanul nagy hatással bírnak az élelmiszertermelésre- és előállításra. A szaporodás energiaigényes folyamat, de az élelmiszer-előállításához szükséges energiafelhasználás csökkenthető a tenyészállatok időegységre jutó utódainak számának növelésével. A reprodukciós technológiák azokat a stratégiákat is meghatározzák, melyek a termelést fokozó tulajdonságok tekintetében genetikai szelekcióra alkalmazhatók. Ebből fakadóan kulcsfontosságú ezen technológiák fejlesztése azon kihívások kezelése érdekében, melyeket a világ népességének várható növekedése fog okozni. [11]

### **3.5. Asszisztált reprodukciós technológiák**

Az egyik fő asszisztált reprodukciós technika a mesterséges termékenyítés (AI). Ez az állatállományok szaporításában az első, széles körben elfogadott asszisztált reprodukciós technológia, mely lehetővé teszi, hogy genetikailag kiváló tulajdonságokkal rendelkező hím egyedektől több utód származzon, mint amennyit a hagyományos párosítással el lehet érni. A konvencionális mesterséges termékenyítés a közelmúltban jelentősen tovább lett fejlesztve azzal, hogy olyan spermiumokat is használhatnak, amelyek áramlási citometria alkalmazásával X-kromoszómát és Y-kromoszómát hordozó spermiumpopulációkra lettek szétválogatva, ezzel lehetővé téve, hogy genetikailag előre determinált ivarú egyedeket hozzanak létre. [14] Ez

magában foglalja a szaporítóanyag gyűjtését és megfelelő tartósítását, tárolását, valamint a megfelelő mennyiségű kompetens spermatozoa megfelelő időben – az ovulációhoz elég közeli időpontban – történő bejuttatását a nőtény reproduktív traktusába. Az optimális AI érdekében a spermát a méhbe kell helyezni, ami a nagyobb méretű állatok esetében (pl. szarvasmarha, ló, bivaly) kivitelezhető rektális tapintással, kisebb állatok esetében (pl. sertés) a cervixbe vagy vaginába történő juttatás lehetséges.

Az ET (embrió transzfer) során az átültetésre szánt embriók előállításának 3 fő módja létezik. Az első a preimplantációs embriók kinyerése a női nemi traktusból. Ennek során gyakran FSH applikálásával szuperovulációt idéznek elő, majd miután megtörtént az ovuláció és az AI, az embriókat a méh átmosásával nyerik ki. A második az IVF (in vitro fertilizáció) technológiával történő előállítás, melynek során az élő állatokból OPU (oocyte-pickup) technikával kinyert vagy vágóhídról származó, kivágott petefészkekből nyert petesejteket in vitro érlelik, majd konvencionális vagy szexált spermával in vitro megtermékenyítik, majd a recipiensbe történő beültetésig tenyésztik. A különböző ultrahang vezérelt technikák megjelenésével, melyeket az élő nőtény egyedekből való oocyták kinyerésére fejlesztettek, az in vitro petesejtérlelés, az in vitro megtermékenyítés és az in vitro embriókultúra megjelenésével gyorsan növekszik az in vitro embrióelőállítás, olyannyira, hogy hamarosan több embrió származhat ezen módszerek által, mint az in vivo technikák alkalmazásával. Egy módszere az in vitro megtermékenyítésnek az ICSI (intracitoplazmatikus spermium injekció), melynek során egyetlen spermiumot injektálnak mikromanipulátorok segítségével közvetlenül az oocytába. Mivel csak egyetlen hímivarsejtre van szükség és az lehet akár sérült vagy elhalt, a módszer alkalmazható oligospermiás vagy nagyfokú spermium defekttel rendelkező hímek utódjainak előállítására. A harmadik módszer az SCNT (szomatikus sejtek nukleáris klónozása), mely egy új módszernek számító sejtalapú technológia, kereskedelmi realitása azonban jelenleg csak szarvasmarhák, sertések és lovak esetében van. SCNT során a donor állatból származó szomatikus sejteket (ezek lehetnek embrió-, magzati- vagy felnőtt sejtek) sejt kultúrára tenyésztik és egy enukleált, a metafázis II. szakaszában lévő oocytával fuzionáltatják, így a petesejt képes lesz az átvitt sejtmagot beépíteni, majd megindul az új embrió fejlődése. A sejtmag átvitele során a donorsejtet a petesejt zona pellucidája alá juttatják mikromanipulátorral, majd összeolvasztják a donorsejtet és a rekonstruált embriók citoplazmáját, melyet elektromos sejt-fúzióval végeznek. Ehhez 3,2 kV/cm feszültségű áramot használnak 20  $\mu$ s ideig 3 impulzuson keresztül. A növekedés serkentése érdekében aktiválják, majd sejt kultúrára növekedni hagyják, végül egy

recipiens nőtény egyedbe átültetik. Gyakorlati jelentősége a nagy genetikai és/vagy anyagi értékkel bíró állatok klónozásában van. [11,12,13,14,17, 24]

Az őssejtelőállítás és manipuláció alapuló technológiák is hasznosak lehetnek olyan új módszerek kifejlesztésében, melyek hím- és női ivarsejtek manipulálására irányulnak. A pluripotens őssejtek (pl. preimplantációs embrionális őssejtek a blasztociszta belső sejtömegeből vagy a primordiális csírasejtekből származó embrionális csírasejtek) olyan sejtek, melyek speciális körülmények között gyakorlatilag bármilyen sejtet képesek létrehozni. Szaporodásbiológiai szempontból lényegesek az SSC sejtek (spermatogonial stem cells/spermatogoniális őssejtek), melyek a herébe beültethetők és megtelepedve spermatogoniába kezdenek. Az OSC sejtek (oogonial stem cells/oogoniális őssejtek) létezése azonban jelenleg vitatott. Az SSC-k sok lehetőséget rejtenek magukban az asszisztált reprodukció tekintetében, akár a magas minőségű szaporítóanyagot termelő hímek számának növelésében, akár a spermatermelés maximalizálása vagy adott genotípusú spermiumok termelésének fenntartása céljából. Továbbá az SSC-transzplantáció eszközként szolgálhat transzgének populációkba történő bevitelében. [11]

Léteznek továbbá egyéb embrió-mikromanipulációs eljárások, ezek között szerepel az embriófelezés és az asszisztált embriókeltetés, valamint az embrió-biopszia, mellyel lehetővé válik a preimplantációs időszakban történő genetikai diagnózis, amellyel a genetikai ivar meghatározásán túl lehetővé válik az embrió genetikai hibáinak azonosítása is. [14]

### **3.6. A nyúltenyésztésben használt asszisztált reprodukciós technológiák**

A nyulak haszonállatként történő hasznosítása mellett fontos szerepet játszanak a nőtények reprodukciós élettanából fakadóan az embriológia és az asszisztált reprodukciós technológia modellezésében, valamint az emberi reprodukció modelljeként is használhatók, mivel a humán és a nyúlembrió fejlődése hasonló. Ezekből fakadóan kísérleti állatként is fontos szerepet töltenek be. A nyulak asszisztált reprodukciós technológiájának fejlődése során sok új ismereteket szert az embrió kinyerése és átültetése, a kriokonzerválás, az in vitro megtermékenyítés, a klónozás vagy a transzgenezis terén. Mindezen ismeretek jól alkalmazhatók a nyúltenyésztésben, mint haszonállatként történő hasznosításban. [17]

### 3.6.1. Embrió-reprodukciós technikák

A 3.5 pontban leírt technikák sikeresen alkalmazhatók nyulak esetében is.

ET során az ovulált petesejtek és a preimplantációs embriók számának maximalizálása érdekében nyulaknál is többféle szuperovulációs protokoll is rendelkezésre áll és használható. Klasszikus protokoll az eCG (equine chorion gonadotropin/ló koriogonadotropin) vagy FSH alkalmazása, eCG applikálása esetén azonban mind a leváló oocyták száma és minősége is nagy változatosságot mutat. A pFSH (pig/sertés folliculus stimuláló hormon) és LH alkalmazásakor szintén változó eredmények születtek. Napjainkban az LH és FSH is könnyen elérhető, és rhFSH (rekombináns humán folliculus stimuláló hormon) önálló vagy LH-val együttesen történő alkalmazásával hatékonyan indukálható szuperovuláció az embrióminőség befolyásolása nélkül. [17,18]

A szuperovuláció elérése után a petesejtek megtermékenyítése történhet in vivo (természetes párosítással vagy mesterséges termékenyítéssel) vagy in vitro. Az embriók kinyerése, melynek szempontjából fontos az embriófejlődés kronológiájának figyelembevétele, történhet nem sebészeti úton, melynek során a termékenyítés után 50-55 órával PGF2 $\alpha$  applikálásával segítik elő az embriók mozgását a petevezetőből vagy a méhből a vagina felé, ahonnan kimoshatók. Post mortem technikával a teljes reproduktív traktus eltávolítása után a petevezetők és a méh elülső harmadának 5 ml 0,2%-os BSA (bovine/szarvasmarha szérum albumin) tartalmú foszfát-pufferolt sóoldattal történő perfúziójával nyerik ki az embriókat. [17,19] Laparoskopos módszerrel embriók és petesejtek is kinyerhetők, ez a technika a minimális invazivitás miatt a több ciklusban történő embriógyűjtés esetén preferált eljárás. A kinyert embriókat morfológiai tulajdonságaik alapján osztályozzák a sejttömeg homogenitása, a zona pellucida és a mucinbevonat épsége alapján. Az átültetésig kriokonzerválják vagy in vitro fenntartásra kerülnek például 0,1%-os BSA-val kiegészített TCM 199 médiumon 500  $\mu$ l paraffinolaj alá rétegzetten 38,5 °C-on, 5% CO<sub>2</sub> mellett és telített páratartalommal, azonban ezen táptalajok elmaradnak az embrió számára optimális, méh által biztosított környezettől, így a kisebb sejttartalom, a kisebb intrazonális átmérő és a mucin védőréteg kisebb vastagsága miatt az átültetés után kisebb vemhesülési arányra kell számítani. [17,20] Maga az átültetés történhet laparotómiával vagy laparoskopópiával, melynek során az embriókat a petevezetőkbe vagy a méhszarvakba ültetik be. Hogy minél sikeresebb legyen az ET, minimális számú embrió

átültetésére, valamint az embriók fejlődése és a recipiens nőtény között aszinkronitás fennállására van szükség. Erre azért van szükség, mert a vemhesség fenntartásához legalább 2 foetoplacentáris egységre van szükség, valamint, ha nagy a túlélési arány az embriók között, a versengés kisebb magzati túlélést eredményezhet. Az optimális tartomány az átültetett embriók számára vonatkozólag 10 és 13 között mozog recipiens nőtényenként. A recipiens genotípusa kulcsfontosságú a megfelelő méhben uralkodó környezet biztosítása szempontjából, mivel ez döntően befolyásolja a megtapadást, az embrió-méh közötti kapcsolatot, valamint a placenta és a magzat fejlődését, ezért fontos, hogy ezek a nyulak anyai vonalból kerüljenek ki. [17,21]

A fentebb leírt IVF és ICSI technika, mint extrakorporális megtermékenyítési technika a nyúl-embrió előállításán terén főleg a tudományos célú klónozás és transzgenezis szempontjából játszik fontos szerepet. Az IVF technika során a petesejteket, miután 5 órán át tartó spermiumokkal történő inkubáció után 1,25 mM piruváttal, 0,1 mM EDTA-val (etilén-diamin-tetraecetsav) és 10% FBS-sel (fetal bovine serum/szarvasmarha magzati szérum) szuszpendált TCM 199 embriókultúra médiumra helyezik, 37 °C-on 5% CO<sub>2</sub> tartalom mellett tenyésztik. ICSI eljárás során 37 °C-on, meleg mikroszkóp állványon, fertilizációs médiumon az érett oocytákat körülvevő cumulus-sejteket hialuronidáz segítségével óvatos pipettázás során távolítják el, majd 5 µm belső átmérőjű injekciós tű használatával a nyúlspermiumokat az oocyták citoplazmájába injektálják. Ezt követően a petesejteket embriókultúra médiumra helyezik. [22,23]

A szintén fentebb részletezett klónozás és transzgenezis alkalmazása az állattenyésztésben, így a nyúl-tenyésztésben sem elterjedt, inkább kísérleti, tudományos célokra használják. Ennek fő oka a nagy genetikai értékű egyedek kiválasztásának nehézsége, valamint a klónozás és transzgenezis megítélése. Újabban a transzgenikus nyulak SCNT technikával történő klónozása nagy szerepet játszik blasztociszta stádiumú embrionális őssejtvonalak létrehozásában. [17]

A létrejött vagy a fentebb részletezett technikákkal létrehozott embriók – akár hosszú időn át tartó – tárolására kifejlesztett eljárás a kriokonzerválás. Ez a technológia alkalmas génbankok fenntartására, kontrollpopulációk létrehozására, továbbá ami az egyik legfontosabb az állattenyésztésben, a nagyfokú mobilitásnak köszönhetően hozzájárul a nagy genetikai értékkel rendelkező állatok genetikai javító szerepéhez. Az eljárás eleinte fagyasztáson alapult, de ezt felváltotta az olcsóbb és egyszerűbb vitrifikáció, mellyel a folyékony közeg gyors lehűlése által elkerülhető a jégkristályok kialakulása, ami a sejtek mechanikai károsodásához, roncsolódásához vezetne, ehhez krioprotektív anyagok alkalmazása szükséges. Ezen eljáráshoz a legalkalmasabb embrió stádium a kompaktálódott morula. [17] Számos protokoll áll

rendelkezésre, erre példa az alábbi: első lépésben az embriókat DPBS-oldathoz (Dulbecco-féle foszfát pufferolt sóoldat) adott 12,5 V/V%-os DMSO-ból (dimetil-szulfoxid) és 12,5 V/V%-os etilén-glikolból álló és 0,2 W/V%-os BSA-val kiegészített vitrifikáló oldatba helyezik 2 percre 20 °C-on, majd a következő lépésben az embriókat egy hasonló összetételű oldatba szuszpendálják 1 percre annyi különbséggel, hogy a DMSO és az etilén-glikol V/V%-os értéke 20-as értéket mutat. Ezután a médiumban szuszpendált embriókat 0,25 ml-es műanyag csövekbe töltik, melyeknek mindkét végére az embriót tartalmazó közegtől légbuborékkal elválasztott DPBS-t adagolnak, majd a csöveget a lezárást és feliratozást követően -196 °C hőmérsékletű folyékony nitrogénbe helyezik. A devitrifikáció során a műanyag csövek (műszalmák) centrális és szélső részeit 20 °C-os vízfürdőbe merítik 10 másodpercig, majd az embriótartalmú vitrifikáló médiumot szacharóztartalmú DPBS oldatba öntik 5 percig, majd tiszta DPBS oldatban még 5 percen át mossák annak érdekében, hogy az embrióra toxikus krioprotektív anyagok szintjét minél inkább csökkentse. [25] Az eljárás hatékonysága számos tényező függvénye, a vitrifikáló médium koncentrációja és összetétele, a hűtés és a felolvasztás körülményei, az embriók kimosása a vitrifikáló médiumból, valamint az embrió és a recipiens nőtény egyed genotípusa döntően befolyásolja és meghatározza ezen tárolási eljárás hatékonyságát és kimenetelét. [17]

### **3.6.2. Mesterséges termékenyítés (AI)**

Az AI alkalmazása nyulakon az európai gazdaságokban az 1980-as évek vége felé jelent meg, alkalmazása jelenleg széles körben elterjedt elsősorban a nagyméretű nyúltelepeken Európában. A természetes pároztatáshoz képest sokkal hatékonyabb módszer használata következtében jelentősen nőtt a telepek termelékenysége, amihez hozzájárult a fokozott termékenységre irányuló genetikai szelekció is. A mesterséges termékenyítés kimenetelét és sikerét számos tényező befolyásolja: a fajta, az életkor, az egészségügyi állapot, a takarmányozás, az évszak (a hőmérséklet és a fény mennyiség miatt), a sperma gyűjtése és tárolása, a biostimulációs módszerek, a nőtény receptivitása mind nagy hatással vannak a sikerességi rátára. [26] Az AI alkalmazásának számos előnye van, az egyik legfőbb, hogy egy napon egyszerre termékenyíthető a telepi menedzsmenttől függően akár az összes anya, akár a kisebb csoportokra osztott anyák, ami több száz vagy ezer állatot jelenthet. Lehetővé teszi a termelés ciklikussá tételét, ami a munkaszervezés szempontjából is nagy előnyt jelent, továbbá jól összehangolható az all-in-all-out rendszerrel, ami kiemelten fontos a takarítás és fertőtlenítés megfelelő elvégzéséhez, ezáltal a járványvédelem hatékony működéséhez. Jelentősen

csökkenthető mesterséges termékenyítés alkalmazásával egyes betegségek terjedésének kockázata, melyek a közvetlen testi kontaktus hiányában háttérbe szoríthatók. [27]

Többféle szaporítási ciklus létezik, úgy, mint a 35, 42, 49 vagy 56 napos ciklus, ezek közül a 42 napos a legelterjedtebb Európában. A 42 napos ciklus során az anyanyulakat az ellés után 11 nappal termékenyítik és a vemhesség átlagosan 31 napig tart, így 42 nap lesz a vemhesség és az újratermékenyítés közti idő együttesen, így, ha pénteken történik a termékenyítés, akkor 42 nap múlva ismét pénteken termékenyíthetők az anyák. A választás az összes utód esetében egyszerre, 28-32 napos korban történik és a növendékek 70-74 napos korban kerülnek értékesítésre. A 35 napos ciklust ritkán alkalmazzák, mivel túl intenzív és túlságosan igénybe veszi az anyákat, ami korábbi selejtezéshez vezetne. Az 56 napos ciklus állatjólléti szempontból kedvezőbb, mivel hosszabb az elléstől az újratermékenyítésig eltelt idő, de a 42 napos ciklus gazdasági szempontból sokkal hatékonyabb, ami az 1 anyára jutó nagyobb évenkénti utódszámban nyilvánul meg. [27]

AI előtt a nőtény nyulak PMSG-vel (pregnant mare serum gonadotropin = eCG) történő hormonális kezelése ajánlott a magasabb receptívitási ráta és fogamzási arány, valamint a nagyobb alomméret elérése érdekében. A tútlápláltság negatívan befolyásolja a szaporodóképességet, ezért a testkondíció alacsonyabb szinten tartása ajánlatos az erőteljesebb hatás kifejtése érdekében. Ugyanakkor a PMSG túlzottan gyakori és/vagy nagy dózisu alkalmazása esetén nagyobb anti-PMSG ellenanyag szint várható, ami alacsonyabb fogamzási rátához és a születés utáni megnövekedett elhullási arányhoz vezethet. Azt is érdemes figyelembe venni, hogy a nem receptív nőtények esetében a hatás elmarad, valamint a fogyasztók jelentős hányada elutasítja a hormonális kezelések alkalmazását az állatiternék-előállításban. Ezen negatív hatások kiküszöbölése érdekében használhatók egyéb biostimulációs módszerek. Ilyen a napi megvilágított órák számának növelése a termékenyítés előtt, vagy a szoptatási időszak alatt a 2 szoptatás között eltelt idő növelése (aminek következtében csökken a prolaktin gátló hatása), azonban ennek következtében csökken a választáskori testsúly. Továbbá hasonló hatás érhető el a szoptatási módszer megváltoztatásával, például, ha az elején nem kontrollálról áttérnek a kontrollált szoptatásra. Ezzel növelhető a fogékonyság és a vemhesülési arány, egyes esetekben akár az alom mérete is. [27]

Az AI 5 lépésből áll: a sperma gyűjtését követően makroszkópos és mikroszkópos vizsgálatra kerül a minőségének ellenőrzése és a felhasználásra való alkalmasság vizsgálata végett. Ha ez megfelelő, ezt követi a sperma hígítása és tárolása, majd a nőtények termékenyítése. Fontos



lépés a termékenyítéssel egy időben a nőtények GnRH-analóggal történő IM (intramuscularis) kezelése, mely a hátulsó láb izomzatába történik. [27]

### **3.6.2.1. Spermával kapcsolatos műveletek**

A mesterséges termékenyítés folyamatát megelőző lépés a megfelelő minőségű nyúlsperma termelése ideális genetikai adottságokkal rendelkező bakokkal. Az erre a célra szánt bakok kiválasztása után kiemelten fontos ezen állatok minél optimálisabb tartási körülményeinek megteremtése, mivel a spermatogenezist számos környezeti tényező befolyásolja, úgymint a hőmérséklet, a fény, az állatok takarmányozása, kora és egészségi állapota. Az állattermék-előállításán túlmenően mind a bakoknak, mind a termelt spermának fontos szerepe van egyes vegyületek in vivo vagy in vitro toxikológiai modelljeként. A nyúlsperma sajátos tulajdonsága a prosztata által termelt granulomok jelenléte, melyek az ejakuláció után kapcsolatba kerülnek a spermiumokkal. Szerepük abban áll, hogy részt vesznek az ovuláció ideje és az akroszóma-reakció közti idő szinkronizálásában azáltal, hogy részt vesznek a párzástól az ovulációig tartó néhány órás időintervallumban a késleltetett korai kapacitációban és az akroszóma-reakcióban, ezáltal annak az esélyét maximalizálják, hogy az ovulált oocyta a legjobb funkcionális állapotban lévő spermiummal találkozzon. [28]

A nyúlsperma gyűjtéséhez mesterséges hüvelyt használnak, mely egy PVC-csőből (poli-vinil-klorid) áll, aminek a belsejébe szilikon gumit helyeznek úgy, hogy a műhüvely két végére hajtják ki a szilikont. A gyűjtőcsövet a műhüvelyhez csatlakoztatják, majd a szabad nyílását vazelinnel vagy más, nem spermicid szülészeti zselével kenik be. Ha az eszköz túl hideg, a PVC-cső és a szilikon közti teret fel lehet tölteni körülbelül 40-45 ml 45 °C-os vízzel. Nagyon fontos, hogy a műhüvely hőmérséklete megfelelő legyen (körülbelül 41-42 °C), mivel, ha túl alacsony a hőmérséklete, a baknak nem lesz elegendő mértékben stimuláló hatású az ejakulációhoz, ha pedig túl magas, a bak vizelni fog, aminek következtében a sperma vizelettel lesz szennyezett. A műhüvely gyűjtő nyílásának mérete a baknak az eszközhöz való alkalmazkodását befolyásolja, így a nagyobb méretű nyíláshoz könnyebben alkalmazkodnak. A sperma levétel során egy nőtény nyulat a nyak bőrénél fogva a bak elé visznek, melynek hatására a bak azonnal megpróbálja befedezni, de ezt megelőzve a pénisz irányába, az elé helyezik a műhüvelyt, így abba történik az ejakuláció, aminek sikeressége a bak nőtényről való oldalra bukásáról ismerhető fel. A gyűjtés hatékonyságának, azaz a spermiumkoncentráció növelésének érdekében alkalmazható előzetes ingerlés, például a bak ketrecére rövid ideig nőtény helyezése. [29,30]

A sperma levételét követően kulcsfontosságú a térfogat mérése és a makroszkópos vizsgálat. Térfogatának mérése előtt, kocsonyaszerű alvadék jelenléte esetén annak eltávolítása szükséges, majd a méréshez a gyűjtőcső mérővonalait használják. A normál értéktartomány 0,3 és 2 ml között mozog, átlagosan 0,8 ml. A makroszkópos megjelenése normál esetben tejfehér színű, homogén, opálos. A vizes megjelenés az alacsony spermiumkoncentrációt jelzi, a sárgás szín vizelet, a barna szín granulomok jelenlétére, a vörös szín pedig vérrel való szennyezettségre utal. Ezek az abnormális makroszkópos megjelenésű ejakulátumok nem használhatók fel, ezért megfelelő elhelyezés után megsemmisítésre kerülnek. A levett sperma a gyűjtést követően 5 percen belül hígításra kerül azonos hőmérsékletű puffer oldattal. Az azonos hőmérséklet kulcsfontosságú a hő- vagy hidegsokk elkerülése végett. A mikroszkópos vizsgálat során értékelésre kerül a spermiumkoncentráció, a motilitás és a spermatozoáktól eltérő sejtek, részecskék jelenléte. A spermatozoa-koncentráció meghatározásához az ejakulátum mintát 1:100 arányban kell hígítani nátrium-citráttal vagy fiziológiás sóoldatban oldott formalinnal, melyet hemacytometer használatával Bürker-, Thoma- vagy Neubauer-kamrában a spermiumok számlálása követ. A spermatozoa-koncentráció normál értéktartománya  $1,5-6 \times 10^8$  sejt/ml között mozog. A spermiumok motilitásának vizsgálata közvetlenül a levétel után történik, ehhez szükséges a minta 1:200 arányú hígítása. A mozgékonyág vizsgálata történhet egyénileg vizuálisan, melynek során a hígított mintából 20  $\mu$ l-t cseppentenek egy tárgylemezre, amit előzetesen 38 °C-ra melegítettek, majd fedőlemezzel fedik, ezt követően fáziskontraszt mikroszkóppal 20x-os nagyításon értékelik a motilis spermiumok százalékos arányát, mely eredményeként csak a több mint 70%-os mozgékonyággal rendelkező spermát használják fel. Ennek a módszernek a hátránya, hogy kifejezetten szubjektív, nagyban függ a vizsgáló tapasztalatától. Egy másik módszer a motilitás vizsgálatára a C.A.S.A. (computer assisted sperm analysis/számítógépes spermaelemzés), ami egy kifejezetten objektív vizsgálati módszer és további, a mozgékonyág jellemzésére szolgáló paraméterek mérésére alkalmas. Az élő/elhalt sejtek arányának meghatározására többféle festési protokoll használható, például propidium-jodid és karboxifluoreszcein-diacetát alkalmazása, mely kiválóan megfesti a sérült sejtmembránnal rendelkező spermiumokat, detektálásuk fluoreszcens mikroszkóppal végezhető. A kapacitáció vizsgálata történhet közvetett vagy közvetlen festési technikák alkalmazásával vagy a hiperaktív spermiumsejtek mérésével, melynek hátterében az áll, hogy a kapacitáció lezajlása után a spermatozoa sejtek kinetikai paraméterei megváltoznak, aminek célja, hogy biztosítsa a kellő sebességet és energiát a petesejt zona pellucidáján történő áthatoláshoz. [29,30]

A spermiumok morfológiai elemzése kulcsfontosságú a sperma felhasználhatóságának és várható termékenyítő képességének megállapítása érdekében. A nyúl spermium az egyéb emlős állatokéhoz hasonló alakú, a fej tojásdad, mérete körülbelül  $7 \times 4 \times 0,5 \mu\text{m}$ , melynek tetején az akroszóma-sapka foglal helyet, a fark hossza  $45 \mu\text{m}$  hosszúságú. A leggyakrabban használt és legoptimálisabb festési eljárás a Papanicolaou-festés, mellyel detektálhatók a különböző sejt-defektusok. A sejtek morfológiájának és rendellenességeinek mélyebb és részletesebb vizsgálatához SEM (scanning/pásztázó elektronmikroszkóp) és TEM (transzmissziós elektronmikroszkóp) használható, melyek alkalmasak továbbá a sejt teljes érettségének megállapítására, a plazma-membrán és mitokondriális hélix pontos vizsgálatára. [29] Egy tanulmányban, melyben a nyulak spermiumainak morfológiai rendellenességeit vizsgálták, megállapították, hogy az összes rendellenesség közül a legnagyobb előfordulási gyakorisága a fark defektusoknak volt, ezen belül a tekeredett farkok, a citoplazmatikus csepp, a görbült farkok és a duzzadt farkok mutatták a legnagyobb előfordulási arányt. A fark rendellenességek után a fej abnormalitások voltak a második leggyakoribbak, a harmadik leggyakoribbak a törött spermiumok voltak. Fontos megjegyezni, hogy a vizsgálat során a variabilitás nagyon magas volt, ezért következtetésképpen levonható, hogy nem állapítható meg egységes előfordulási valószínűség, ezért minden gyűjtött spermát mikroszkóposan vizsgálni kell a morfológiai rendellenességek detektálása érdekében a termékenyítés előtt, ami elengedhetetlen az AI sikeres véghezvitele érdekében. [31]

Az inkubáció és a tárolás előtt a sperma minőségének megőrzése érdekében annak hígítása szükséges megfelelő hígító pufferoldat alkalmazásával, ami lehet pl. Galap vagy Tris-puffer, ami 24-48 órán át történő tárolásra alkalmas, de fiziológias sóoldat is használható, azonban ez csak nagyon rövid ideig történő tárolásra alkalmazható (körülbelül kevesebb mint 1 óra). Nagyon fontos a megfelelő hígítási arány alkalmazása, ami a sperma minőségi tulajdonságaitól függően 4-től 10-szeres hígításig terjedhet. A túlzottan nagy hígítási arány alkalmazása a spermiumok motilitására káros hatással lehet, valamint a kulcsszerepet játszó ondóplazma túlzott hígulását okozza. Ezek együttesen a spermiumok kinetikai tulajdonságainak csökkentésével rontják a termékenyítő anyag minőségét és ezzel a termékenyítő képességet. Fontos, hogy a hígítás fokozatosan történjen, cseppenként adagolva, amiket óvatos keverés kövessen a kezdeti térfogat kétszeresének eléréséig, majd nagyobb mennyiségű hígító adható egyszerre a kívánt hígítási arány eléréséig. Ezt követően fél-egy órás állás után a motilitás újbóli értékelése szükséges, ennek során kiemelten fontos, hogy ez ne történjen túl korán és túl gyorsan, ugyanis a hígítás folyamata átmeneti károsodást okozhat, így egy túl korán és túl

gyorsan jó minőségűnek vizsgált sperma minősége később romolhat, ami a termékenyítés csökkent sikeréhez vezethet. [29,30,32]

Hígított, friss sperma használata esetén az eddig leírt műveletet követően elvégezhető a mesterséges termékenyítés, azonban a hosszabb ideig való tárolás céljára lehetőség van a sperma hűtve, illetve fagyasztva tárolására.

A sperma hűtve tárolásával a megtermékenyítő képesség akár 48 órán át is megőrizhető, ami hosszabb idő, mint amennyit a friss sperma maximális tárolási ideje (általában legfeljebb 18 óra). Ennek következtében lehetőség nyílik az értékes szaporítóanyag szállítására a viszonylag közeli gazdaságok között, hosszabb szállításra azonban ez az idő nem elegendő. A felhasználható különböző extenderek, a hűtési hőmérséklet és a tárolási idő vizsgálatára született egy tanulmány. Ebben 3 Tris-alapú extender felhasználásával 5 °C-on illetve 15 °C-on 96 órán át tartó tárolást követően vizsgálták a spermiumok motilitását, akroszóma integritását, életképességét, mitokondriális funkcióját, DNS (dezoxiribonukleinsav) integritását és ROS (reactive oxygen species/reaktív oxigéngyökök) termelését. Ezt követően egy második kísérletben a megtermékenyítő képességet vizsgálták és arra az eredményre jutottak, hogy a legjobb spermaminőséget 15 °C-on érték el, de 5 °C-on alacsonyabb ROS-termelődést volt tapasztalható, valamint a fertilitás is 5 °C-on történő tárolást követően volt magasabb. [42]

A fagyasztva tárolás (kriokonzerválás) során a sperma gyűjtését követően a sperma hígítására a fagyasztva tárolásra alkalmas extendereket használnak, melyek az ozmotikus hatások, a jégkristályok okozta sejtkárosodások és az inadekvát pH hatásainak kivédésére szolgál. Ezt követően lassú, fokozatos hűtéssel megy keresztül a sperma egy programozott inkubátorban. Ezután műanyag csövekbe (műszalmákba) adagolják a szaporítóanyagot, ezeket folyékony nitrogéntartályokba helyezik, amikben -196 °C-on kerülnek tárolásra, felhasználás előtt közvetlenül pedig meleg vízben kerülnek felolvasztásra. A hűtés, a fagyasztás és felolvasztás folyamán sejtmembrán, a citoplazma és a genomiális struktúrák károsodnak a hidegsokk, az intracelluláris jégkristályok képződése, az ozmotikus stressz és a ROS molekulák fokozott képződése következtében. Emiatt kiemelten fontos a megfelelő fagyasztott sperma tárolására alkalmas hígító-oldatok és krioprotektív anyagok és egyéb kiegészítő eljárások használata ezen káros hatások minimalizálása érdekében. Ezen problémák hatásainak mérséklésére alkalmazhatók antioxidánsok, melyekkel az oxidatív stressz csökkenthető, a jégkristályok mechanikai kártételének kiküszöbölésére a fagyási sebesség csökkentése és a krioprotektív anyagok használata alkalmas, azonban ezen anyagok a védő hatásuk mellett ozmotikus és toxikus stresszt is jelentenek a sejteknek, amit a hidegsokk mérséklésére szolgáló lassú hűtési

sebesség tovább fokoz. A jégkristályok képződésének további gátlására alkalmazhatók bizonyos AFP fehérjék (antifreeze-proteins/fagyálló fehérjék), melyek hideg környezetben élő gombák, baktériumok, növények, rovarok és halak természetes alkotói, ezen belül főleg az AFP III. használatával javítható a motilitás, az akroszóma integritása, a mitokondriális aktivitás és a spermiumok életképessége, azonban a nehéz kivonhatóság miatt egy tanulmányban ennek helyettesítésére PVA-t (polivinil-alkohol) használtak, amellyel produkálhatók voltak a felsorolt pozitív hatások. [33,36] A fagyasztásra alkalmas extenderek pufferből (nyulak esetében leggyakrabban Tris-pufferből), sókból és krioprotektív anyagokból tevődnek össze, valamint jellemzően a nyúlisperma fagyasztása esetén, a tojássárgájának kifejezetten pozitív hatása van a spermiumok motilitására és fertilitására a hidegsokk megelőzése által, azonban higiéniai aggályok miatt ennek felhasználása korlátolt, ezért lecitinnel helyettesíthető, melyre a szójabab eredetű lecitin kiválóan alkalmas. További összetevőként alkalmazható még sovány tej, azonban ez kevésbé elterjedt. Krioprotektív anyagként alkalmazhatók permeábilis vegyületek, mint például etilén-glikol, glicerin, DMSO vagy egyes amidok (például laktamid vagy acetamid), ezek a citoplazmába bejutva az intracelluláris szabad vízhez kötődve akadályozzák meg a jégkristályok képződését. Egyes tanulmányok azonban megállapították, hogy bár a leggyakrabban használt permeábilis vegyületek a DMSO és a glicerin, ezen anyagok negatívan befolyásolhatják a sperma minőségét, ezért sokkal előnyösebb és pozitívabb hatású lenne az amidok, például a fentebb említett laktamid vagy acetamid előnyben részesítése. [33,34,35] Nem permeábilis vegyületek felhasználásával, mint a lipoproteinek, szacharidok (például laktóz, szacharóz, maltóz vagy dextrans) vagy a Ficoll, extracellulárisan a sejtek körül az ozmotikus nyomás fokozásával fejtenek ki a sejtekre vízelvonó hatást, valamint sejtmembránt stabilizáló szerepük is bizonyított a membrán foszfolipidekkel való kölcsönhatás révén. Fontos a megfelelő tárolóeszközök megválasztása a fagyasztás során, ugyanis a spermiumok hővezetése összefüggésben áll az eszköz anyagi minőségével, alakjával, méretével, így ezen tulajdonságok befolyásolják és meghatározzák a hűtés, a fagyasztás és a kiolvasztás sebességét. Erre a célra alkalmazhatók üvegfiolek, műanyag ampullák, PVC-csövek és a széles körben elterjedt műszalmák. Maga a fagyasztás két úton történhet: az egyik módszer lassú fagyasztás során az EC (extracelluláris) víz fagyása gyorsabb, mint az IC (intracelluláris), az IC jégkristályképződés gátolt, azonban az extenderben lévő vegyületeknek való kitettség elhúzódóbb; a másik módszer a vitrifikáció, melynek során a spermát hirtelen folyékony nitrogénbe helyezik, így a krioprotektív anyagoknak való közvetlen kitettség – amelyek egyben védik is a sejteket a jégkristályképződés hatásaitól – minimális ideig tart. [33,37] A felolvasztás sebessége szintén fontos paraméter a spermiumok minőségének megőrzése kapcsán. A

hosszabb idő alatt történő felolvasztás kedvez a több és kisebb méretű jégkristály keletkezésének és aggregálódásának, mint a kevesebb, de nagyobb kristály képződésének, aminek következtében a sejtet nagyobb mértékű mechanikus károsodás éri. Ebből kifolyólag általános szabályként alkalmazzák, hogy a felolvasztást testhőmérséklet-közeli hőmérsékleten kell végezni rövid idő alatt. Bár a felolvasztás hőmérsékletét több tényező is befolyásolja, az abszolút optimális hőmérséklet megállapításához további vizsgálatok szükségesek. [33,38]

### **3.6.2.2. Inszeminálás és a vemhesség megállapítása**

Az inszeminálás hígított, friss spermás termékenyítés esetén a hígítási eljárást követően elvégezhető, fagyasztott spermát használó eljárás esetében a kellő gondossággal elvégzett felolvasztást követően. A szexuálisan fogékony nőtény nyulak kiválogatása után, azokat egy rögzítő boxba helyezik, amiben a nyak szabadon mozoghat. A box aljának csúszásmentesnek kell lennie, ezért gyakran gumimatracal bélelik ki ennek érdekében. [39]

A hígított spermát tartalmazó műszalmát egy inszemináló hüvelybe helyezik, majd a hüvelyt inszemináló pisztolyba teszik. A nyulat a fent leírt módon rögzítik vagy egyszerűen egy asztalon megfogják, majd a bőrt a farok tövéénél megfogva alkarral a gerinc mentén lassan felemelik a hátsó testfélét, úgy, hogy a genitális nyílás a lehető legmagasabban helyezkedjen el, ezzel a művelettel lordózist váltunk ki, ami a nyulak szaporodása során a természetes felvett testhelyzet. Ez információval szolgál a nőtény szexuális fogékonyságáról, ugyanis a nem fogékony nőtény egyed a farok bőrének megfogásakor nem emeli fel a hátsó testrészét, hanem farkát szorosan a gáttájékhoz szorítja. A péra színe is jelzi a receptivitást, a nőtényt akkor tekintik szexuálisan fogékonynak, ha ez vörös színű. Ezután az inszemináló pisztolyt a péranyílásba helyezik, majd a gerinc felé fordítva vezetik egészen a hüvely felső részéig, a méhnyak kezdetéig, majd a dugattyú meghúzásával a spermát intravaginálisan a genitális traktusba juttatják, ezután a pisztolyt kihúzzák, majd ezt követően a nőtény leül. Mivel a nyulak uterus duplex típusú méhvel rendelkeznek, ami által két különálló méhszarvval és méhnyakkal rendelkeznek, melyek a vaginába nyílnak és közöttük nincs kapcsolat, ezért intracervikális termékenyítés esetén mindkét méhnyakba be kell juttatni a termékenyítőanyagot. Fontos, hogy a folyamat véghezvitele során a nőtény mozdulatlan helyzetben legyen tartva. A termékenyítést követően ovuláció indukció céljából a hátsó combizomzatba GnRH-analógnaként leggyakrabban 0,2 ml buserelint applikálnak IM, szuperovuláció esetében 0,4 ml-t. [30,39,43]

A vemhesség korai megállapítása kulcsfontosságú a hatékony munkaszervezés és a két termékenyítés közti idő csökkentésében, a nem vemhes nőtények mielőbbi újra termékenyítése, valamint a vemhes nőtények megfelelő takarmányozásra állításának érdekében. A hagyományos vemhességvizsgálati módszer a kézzel történő tapintás, ami a vemhesség 10-14. napja között végezhető megbízhatóan. Előnye, hogy nincs nagy eszközigénye, tapasztalt vizsgáló kellő magabiztossággal diagnosztizálhatja a magzatok jelenlétét, azonban fals-pozitív eredményt adhat a belek gázzal- vagy béltartalommal való teltsége. Fő hátránya, hogy a túlzott erővel végzett palpáció a magzatok károsodását vagy akár abortuszt is okozhat. A képalkotó eljárások közül a radiográfia is rendelkezésre áll, ez a módszer a vemhesség 11. napja után lehetséges, azonban ennek alkalmazása nem gyakorlatias a nyúltartó telepeken, ezért használata mellőzött. Kifejezetten megbízható, gyors, biztonságos és praktikus módszer a valós idejű transzabdominális ultrahangvizsgálat, mely nyulak esetében a vemhesség 7. napjától alkalmazható kellő pontossággal, továbbá a vizsgálat során mellékletként diagnosztizálhatók egyes kóros elváltozások. [39,40]

Elterjedt vemhességdiagnosztikai módszer továbbá a progeszteronszint mérése vérplazmából vagy szérumból ELISA-kitek (enzyme-linked immunosorbent assay) használatával, mely alkalmas továbbá ovuláció előrejelzésre, valamint a vemhesség és álvemhesség megkülönböztetésére. [41]

#### **4. Célkitűzés**

Szakdolgozatom célja egy hazai, asszisztált reprodukciós technológián belül mesterséges termékenyítést alkalmazó nyúltelep termékenyítési és termelési adatainak leíró- és összehasonlító statisztikai elemzése volt. Ennek során célom volt az általam felállított nullhipotézisek alátámasztása vagy cáfolása.

#### **5. Anyag és módszer**

A termékenyítési és termelési adatok leíró- és összehasonlító statisztikai elemzését a Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetemhez tartozó MATE Tangazdaság Nonprofit Kft. kaposvári nyúltelepének adatbázisából végeztem. A mesterséges termékenyítési eljárás eredményeként kapott adatokat a 2000. január hónap és 2010. december hónap közötti időszakban értékeltem.

### **5.1. A telep mesterséges termékenyítési protokollja (spermával kapcsolatos műveletek, inszeminálás)**

Az általam vizsgált állattartó telepen a bakoktól származó termékenyítőanyag a telepen végzett termékenyítések mellett háztáji tenyésztésben is felhasználásra kerülnek. Az előállított spermát megvásárló külső partnerek változó gyakorisággal, általánosságban véve heti 1-2 alkalommal jelentkeznek termékenyítőanyag vásárlása céljából. Emellett, ami a levett sperma fő felhasználási területe, a telepen a nőtény nyulak termékenyítése 8 hetente, fajtánként 1-1 hét csúszással történik.

A spermavételt a telepen alkalmazott állatgondozók végzik, melynek során műnyúl és meleg vízzel feltöltött műhüvely segítségével veszik le a spermát a bakoktól és azokat egyedenként elkülönítve 1-1 kémcsőbe gyűjtik.

Ezt követően megtörténik a levett minták makroszkópos, illetve mikroszkópos vizsgálata és értékelése. A makroszkópos vizsgálat során a legfontosabb szempont, amit néznek, az a minta színe és állaga. Az ideális és termékenyítésre alkalmas minta színe tejfehér, állaga pedig nem lehet sem túl híg, sem túl sűrű. Ezek mellett további fontos szempont a minta homogenitása, opálos áttetszősége, valamint kocsonyaszerű alvadék jelenléte esetén annak eltávolítása. A megfelelő makroszkópos megjelenés esetén a következő lépés a minta mikroszkópos vizsgálata. Ennek során a legfontosabb szempontok a spermiumok aktivitása, mozgékonyága, valamint az élő sejtek aránya. Továbbá keresik még idegen anyag jelenlétét. Ha a mintában idegen anyag van jelen és/vagy a sejtek összenövése, a spermiumok koordinálatlan vagy nagyon lassú mozgása látható, a mintát termékenyítésre alkalmatlannak minősítik, felhasználásuk nem lehetséges.

A termékenyítésre alkalmasnak talált minták hígítása 5 ml mennyiségű bidesztillált vízben feloldott Merk III típusú spermahígítóval történik.

A termékenyítés hígított, friss spermával történik, melyből nőtényenként 1 ml mennyiséget használnak fel. A termékenyítőanyagot katéteren keresztül juttatják a nyulakba intravaginálisan. Az inszeminálás előtt a termékenyítendő nőtényekbe a petesejtleválás elősegítése és serkentése céljából buserelin GnRH-analóg tartalmú Suprefact nevű készítmény parenterális applikálása történik.



## 5.2. Fajták

A telepen alapvetően 3 különböző fajta tenyésztése folyik. Ezek a Pannon Ka, a Pannon fehér és a Pannon nagytestű fajták.

Fajtánként 4 vonalat különböztetnek meg, melyeket a Pannon Ka esetében 6, 7, 8, 9; a Pannon fehér esetében 1, 2, 3, 4; a Pannon nagytestű esetében K, A, M, E betűkkel különböztetnek meg egymástól. A párosítások ezen jelölések alapján történnek az 1. táblázatban foglaltak szerint.

**1. táblázat:** Párosítások az egyes fajtákhoz tartozó vonalakkal

Pannon Ka		Pannon fehér		Pannon nagytestű	
anya	bak	anya	bak	anya	bak
6	9	1	4	A	K
7	6	2	1	M	A
8	7	3	2	E	M
9	8	4	3	K	E

## 5.3 Vemhességvizsgálat és a született utódok hasznosítása

A vemhesség megállapítása a telepen a vemhesség 14-21. napja között történik. Ebben az időszakban már nagyobb pontossággal és egyértelműbben diagnosztizálható a termékenyített nyulak vemhessége. A vizsgálat abdominális tapintási módszerrel történik, melynek során az egyik kézzel a nyúl hátsó testfelét megemelik, majd másik kézzel a has alulról és két oldalról történő tapintásával a magzatok érezhetőek, így a vemhesség diagnosztizálásra kerül.

A fialás után a született kisnyulak egy része szelekció alapján a telep tenyész-utánpótlásaként kerül hasznosításra. Erre a célra korosztályonként és fajtánként körülbelül 30-40 darab kerül meghagyásra, melyek között vegyesen található nőstény és bak nyúl egyaránt. Korcsoportonként körülbelül 80-100 darab nyúl külső partnereknek kerülnek eladásra háztáji tenyésztésbe. A megmaradt nyulak pedig végtermékként vágóhídon kerülnek értékesítésre.

## 5.4. Statisztika

Az általam vizsgált telep termékenyítési és termelési adatainak kiértékeléséhez leíró- és összehasonlító statisztikát használtam. Az adatok táblázatba való rendezéséhez Microsoft 365 Excel programot használtam. A leíró- és az összehasonlító statisztika készítéséhez szintén Microsoft 365 Excelt használtam.

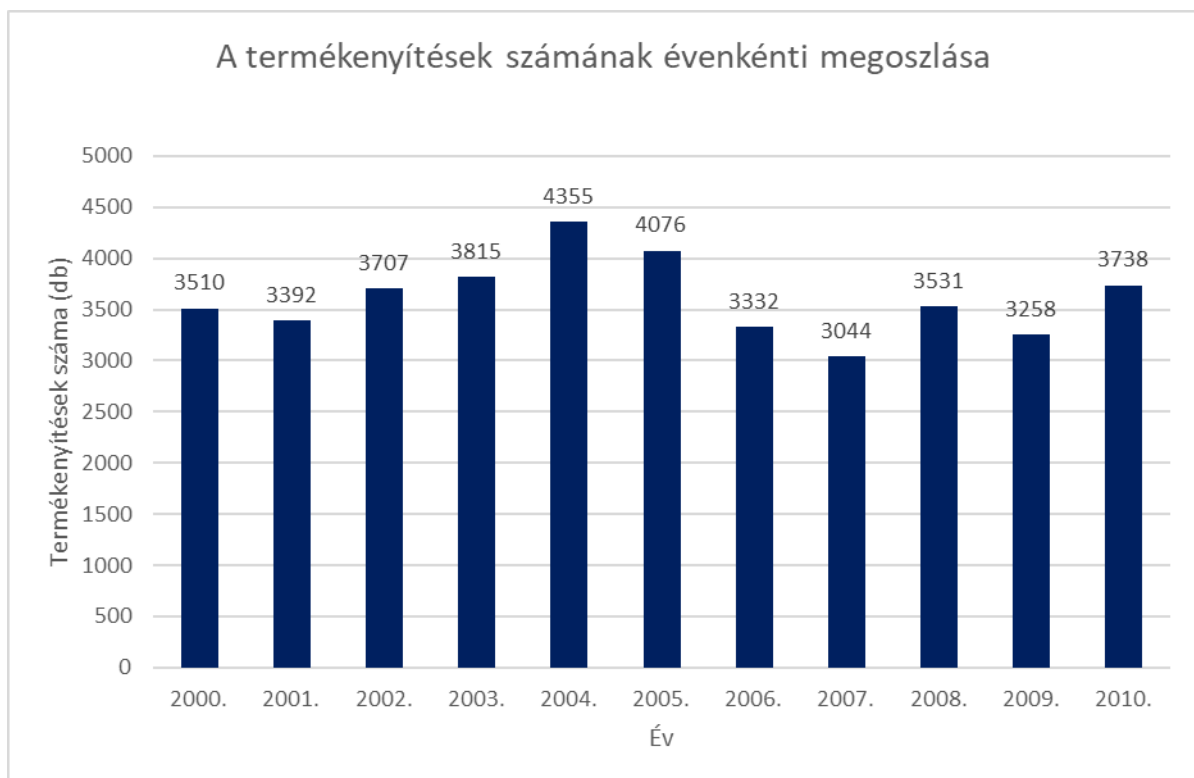
A leíró statisztikát a 2000-2010 közti időszakról készítettem.

Az összehasonlító statisztikát szintén a 2000-2010 közti időintervallum adataiból készítettem, melynek során korrelációvizsgálattal kerestem bizonyos paraméterek közti kapcsolatot és a megállapított trendek irányának és a kapcsolatok szorosságát leíró korrelációs koefficiensek vizsgálatával tudtam az általam felállított nullhipotéziseket alátámasztani vagy megcáfolni.

## 6. Eredmények

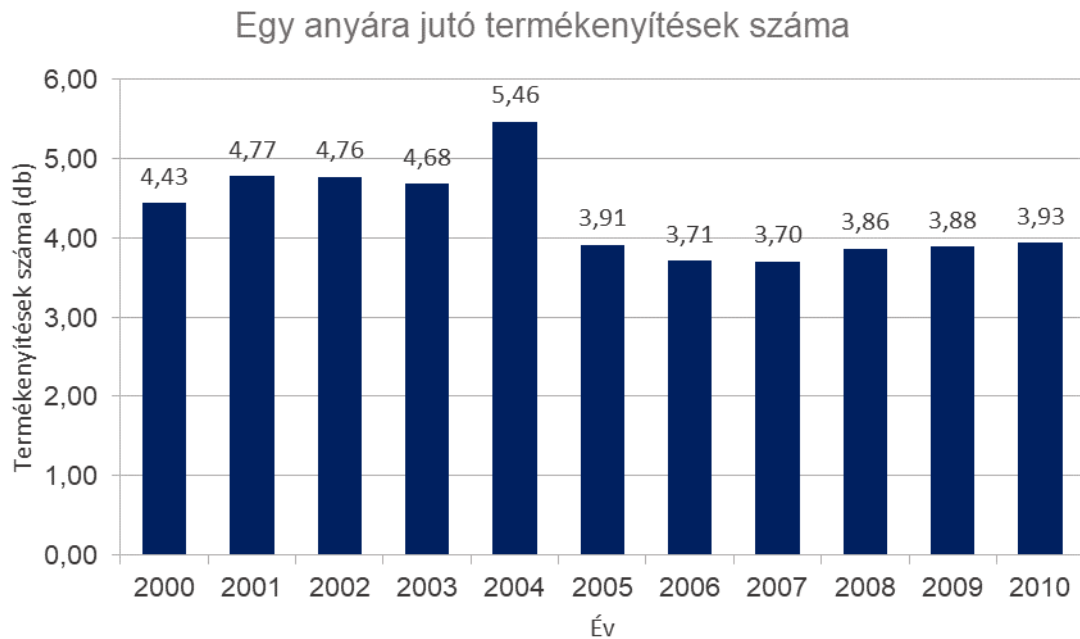
### 6.1. Leíró statisztika

A termékenyítések számának évenkénti megoszlása alapján 2000 és 2004 között emelkedés figyelhető meg, majd csökkenő tendencia mutatkozik, a 2004 és 2010 közötti időszakban átlagosan 3496,5 termékenyítés volt, míg a 2004 előtti időszakban ez 3755,8 volt. (1. ábra)



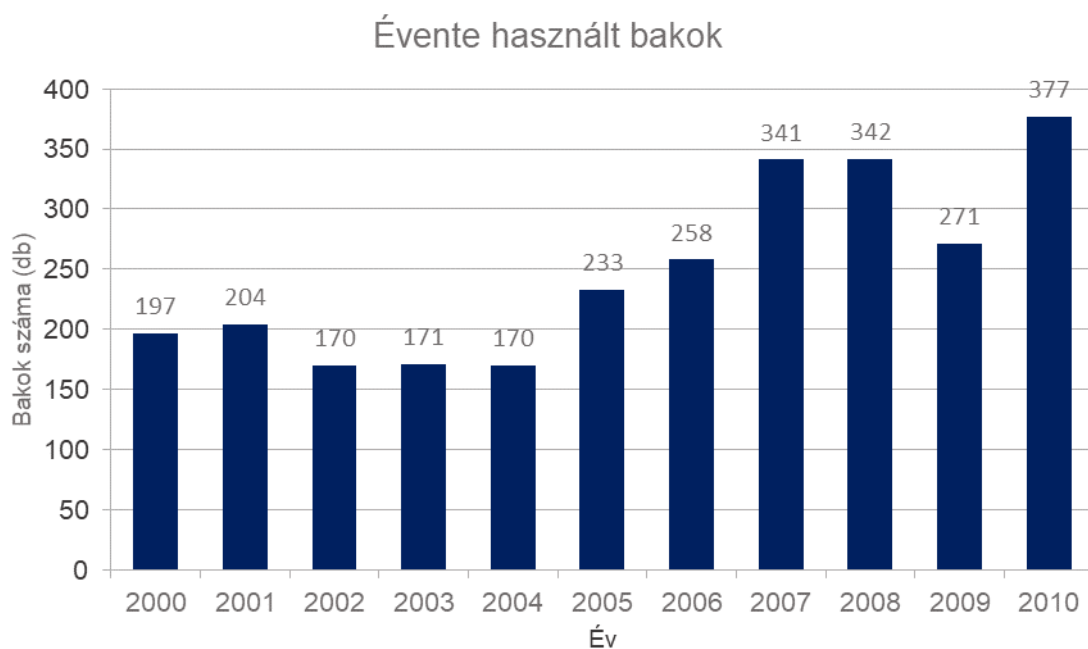
1. ábra: A termékenyítések évenkénti megoszlása

Az egy anyára jutó átlagos termékenyítések számának évenkénti megoszlása hasonló tendenciát mutatott, a 2004-es csúcsig emelkedés, majd csökkenés volt megfigyelhető. Itt az első időszakban 4,82 volt az átlag, majd a 2004 után a második időszakban már csak 3,39. (2. ábra)



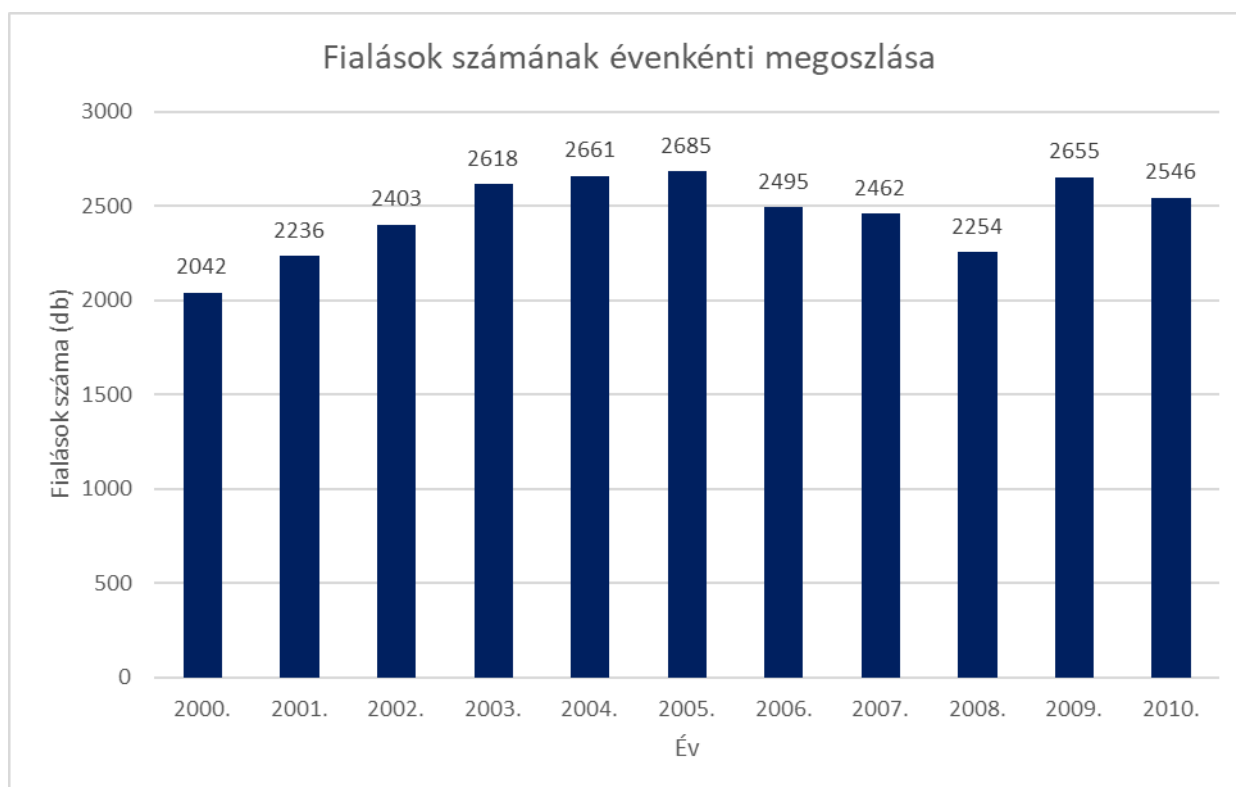
**2. ábra:** Egy anyára jutó termékenyítések száma évente

Az évente összesen használt bakok számának éves alakulásában 2010-ig egyenletes növekedés figyelhető meg, 2009-ben volt tapasztalható enyhe visszaesés, azonban 2010-ben ismét növekedett. Egy baktól származó termékenyítőanyagot több nőtény nyúl termékenyítésére is használtak. (3. ábra)



**3. ábra:** Évente használt bakok számának éves alakulása

Az évi fialások száma 2005-ig növekvő tendenciát mutat, majd egy 2008-ig tartó csökkenést követően 2009-ben és 2010-ben ismét növekedés volt tapasztalható. Ez a trend a termékenyítések számának évenkénti megoszlásával összhangban van. (4. ábra)



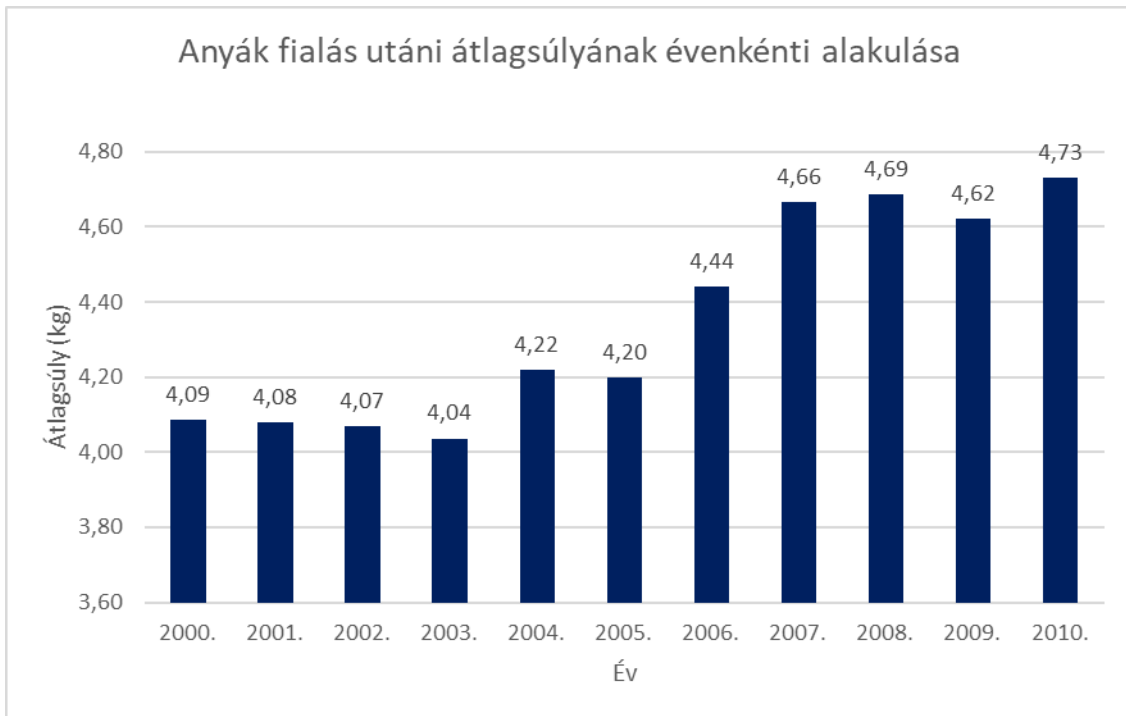
**4. ábra:** Fialások évenkénti száma

Az évenként élve született utódok számának a vizsgált időszakban alakult tendenciája megegyezik az évi fialásszám trendjével. 2005-ig egyenletes növekedés, majd 2008-ig csökkenés, majd 2009-ben és 2010-ben ismét növekedés volt tapasztalható a 2006-2008 közötti időszakhoz képest. (5. ábra)



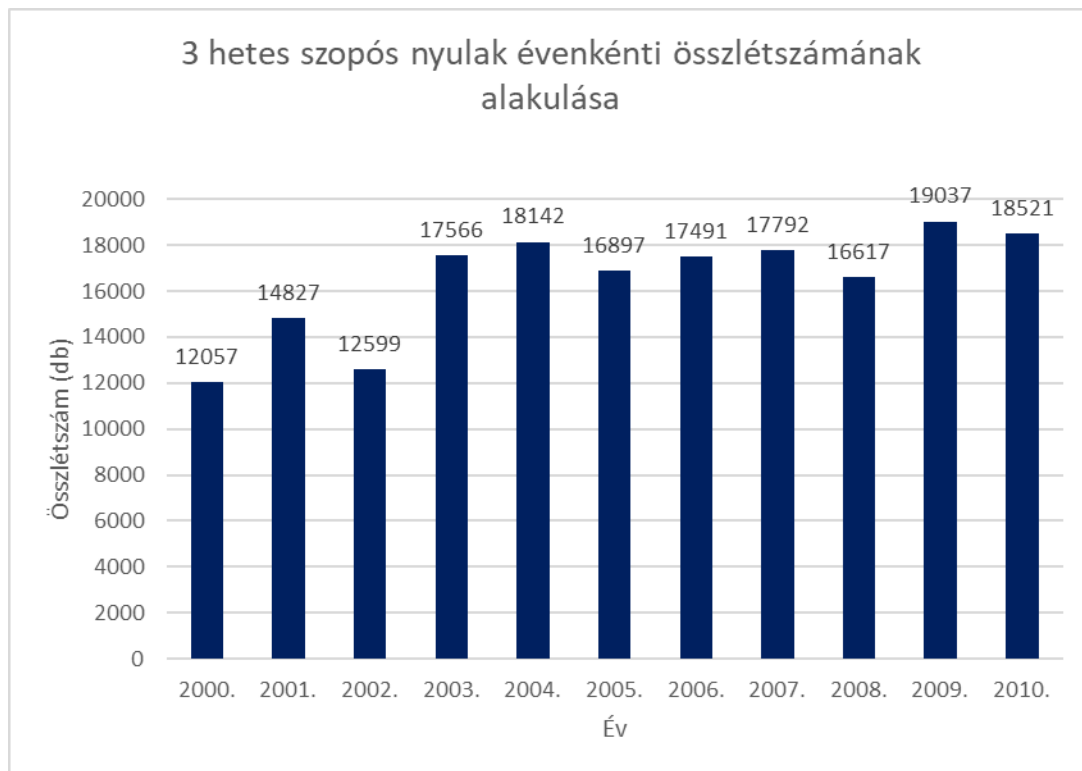
**5. ábra:** Élve született utódok száma évente

Az anyák fialás utáni átlagos súlyának alakulása egyenletes növekedést mutat. Míg 2000-ben 4,09 kg volt, addig 2010-ben már 4,73 kg volt az anyák átlagos súlya a fialás után. (6. ábra)



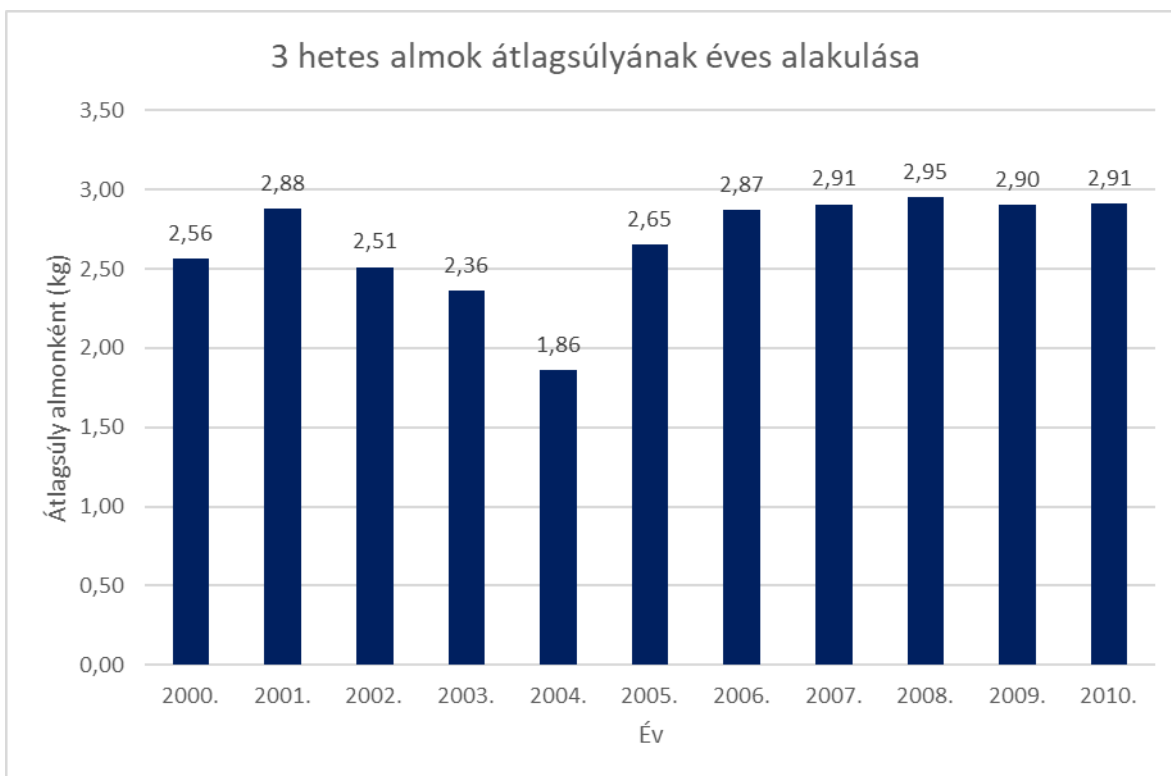
**6. ábra:** Anyák fialás utáni átlagos súlya évente

A 3 hetes szopós nyulak éves összlétszámának alakulása kezdetben alacsonyabb volt, 2000 és 2002 között az átlag 13161 utód volt, majd jelentős növekedés indult el, 2003 és 2010 között viszonylag stagnált, ekkor az átlag 17758 utód volt. Az almok átlagos létszáma 2000 és 2005 között 7, míg 2006 és 2010 között 8 volt. (7. ábra)

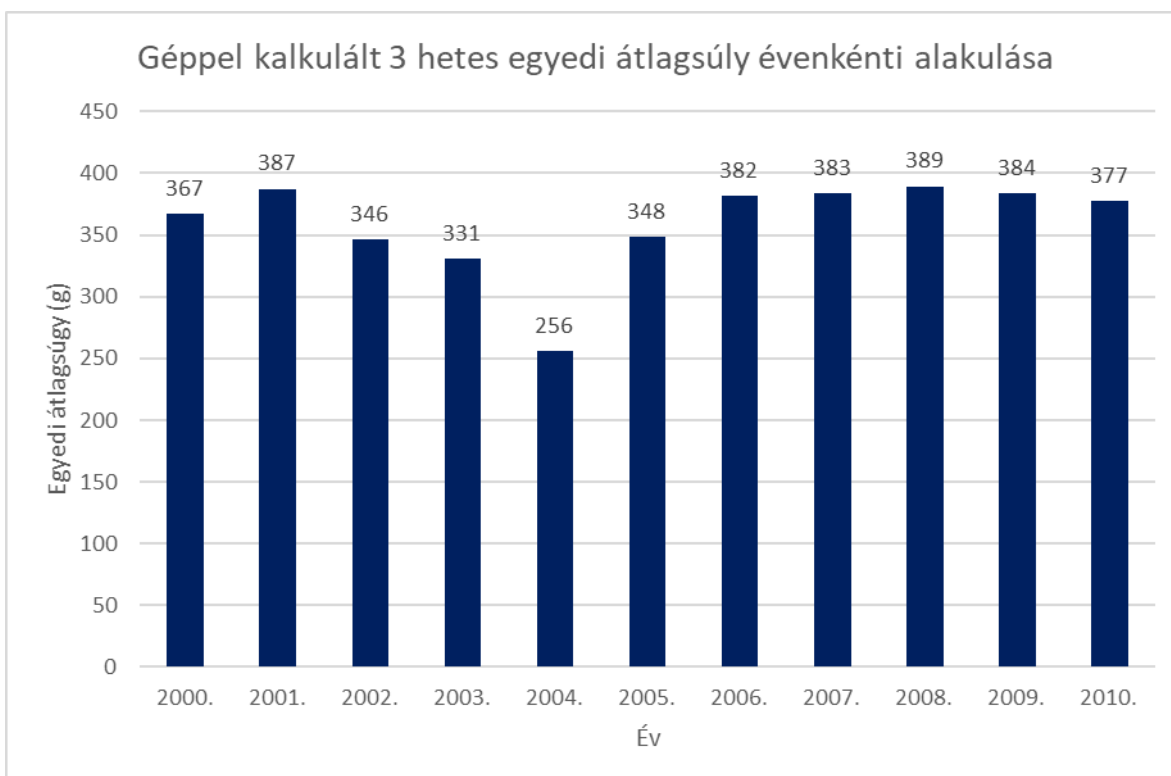


**7. ábra:** 3 hetes szopós nyulak évenként összlétszáma

A 3 hetes almok átlagsúlyának éves alakulásában 2000-2001 között enyhe emelkedés, 2001-2004 között csökkenés, majd 2004-től ismét növekedés volt megfigyelhető, 2006-2010 között pedig stagnált. A kisnyulak géppel kalkulált egyedi súlyának éves átlagának tendenciája követi az almok átlagsúlyának trendjét. (8. és 9. ábra)



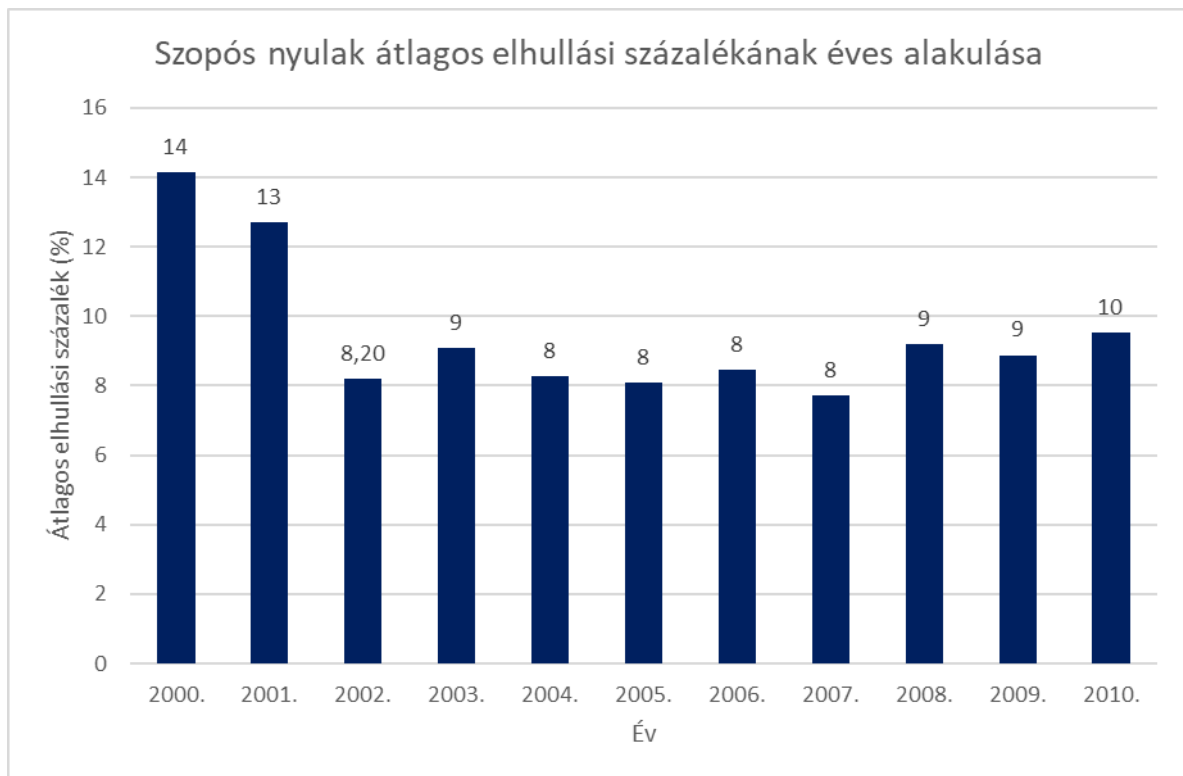
**8. ábra:** 3 hetes almok átlagsúlyának alakulása évente



**9. ábra:** A 3 hetes szopós nyulak egyedi átlagsúlyának alakulása évente

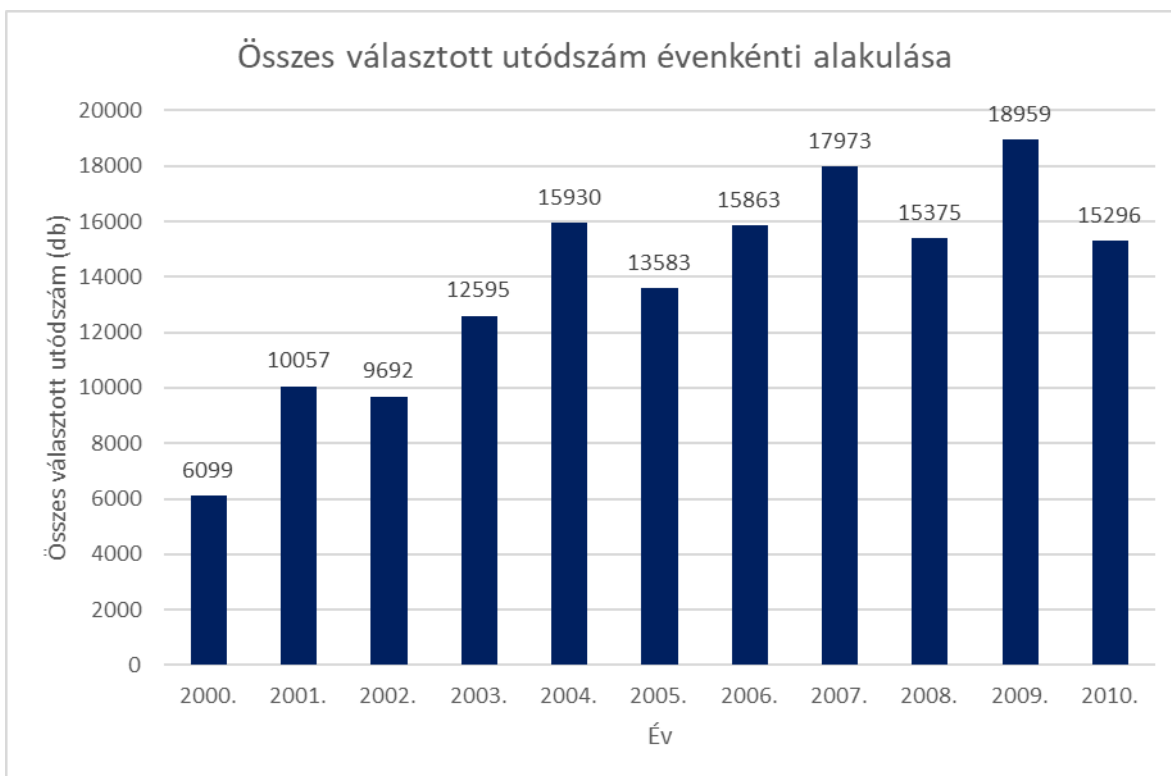


A szopós nyulak átlagos elhullási százalékának a fialás és 3 hetes kor közötti éves alakulása 2000-ben és 2001-ben magasabb volt, majd csökkenés következett be és 2002-2010 között stagnálás figyelhető meg. Az átlag 2000-2002 között 12 volt, míg 2003-2010 között csak 9. (10. ábra)

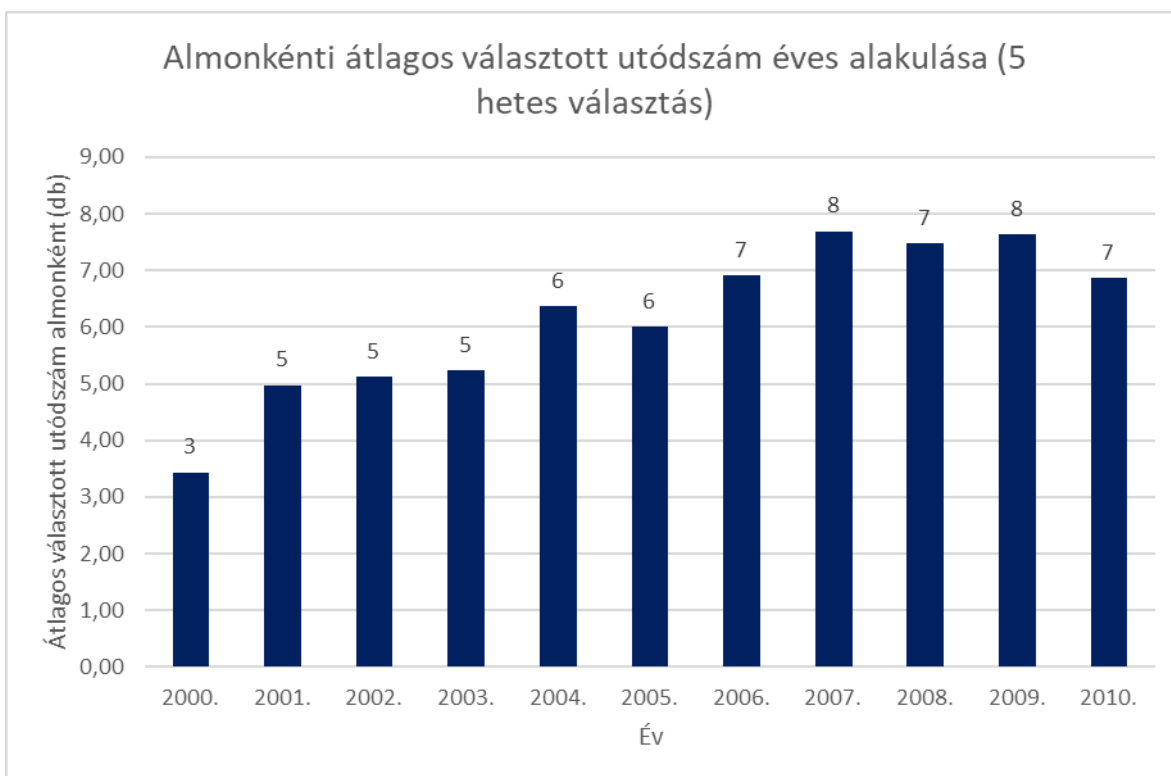


**10. ábra:** Átlagos elhullási százalék alakulása évente a (fialás és 3 hetes kor között)

Az évente választott összes utódszám alakulása 5 hetes választás esetén a tendencia a 3 hetes szopós nyulak évenkénti összlétszámával párhuzamos tendenciát mutatott. 2000 és 2002 között ez a szám alacsonyabb volt, ebben az időintervallumban az átlag 8616 nyúl volt, majd ez a szám 2003-ban növekedésnek indult, közben 2005-ben, 2008-ban és 2010-ben enyhe visszaesés volt tapasztalható, 2003-2010 között átlagosan 15697 nyulát választottak. Az almonként átlagosan választott utódszám követi ezt a tendenciát. (11. ábra, 12. ábra)

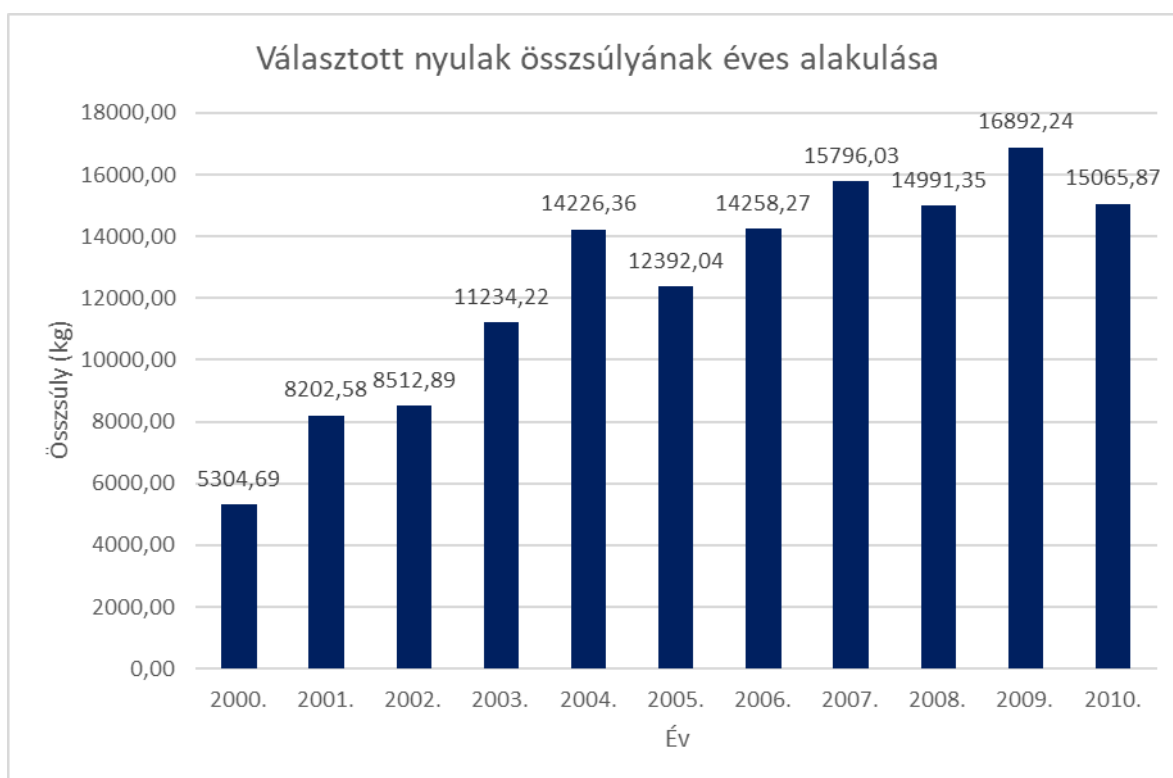


**11. ábra:** Évente összesen választott nyulak száma



**12. ábra:** Évente átlagosan választott nyulak száma almonként

Az évente választott nyulak összsúlyának alakulása igazodik az évente összesen választott nyulak számához. 2000-2002 között ez a szám alacsonyabb volt, ekkor az átlag 7340,05 kg volt, majd 2003-tól növekedés indult meg, közben 2005-ben, 2008-ban és 2010-ben volt tapasztalható enyhe visszaesés, 2003-2010 között a választott nyulak összsúlyának átlaga 14357,05 kg volt. A választott nyulak almonkénti átlagos összsúlyának alakulása növekvő tendenciát mutat, ebben az esetben 2000-2003 között volt alacsonyabb az átlag, ami ebben az időintervallumban 4,05 kg volt, majd 2004-2010 között 6,42 kg-os átlagra növekedett. (13. ábra, 14. ábra)



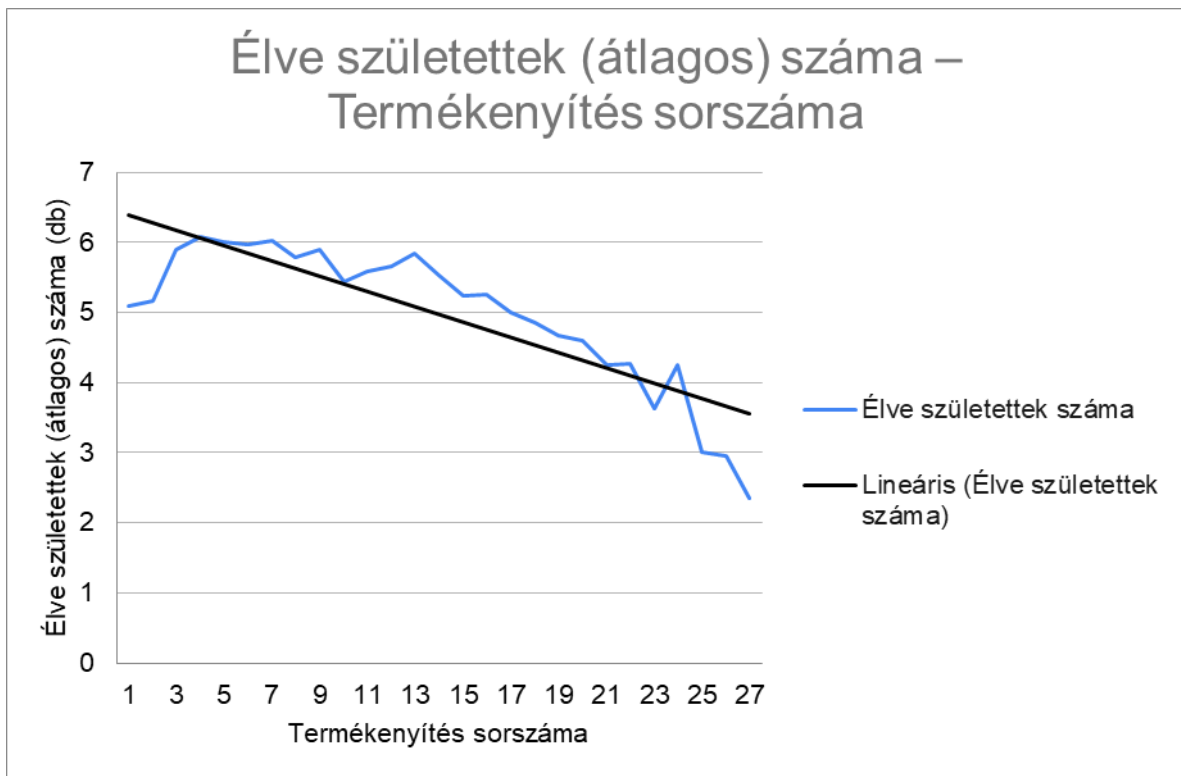
**13. ábra:** Választott nyulak összsúlyának alakulása évente



**14. ábra:** Választott almok átlagos összsúlya évente

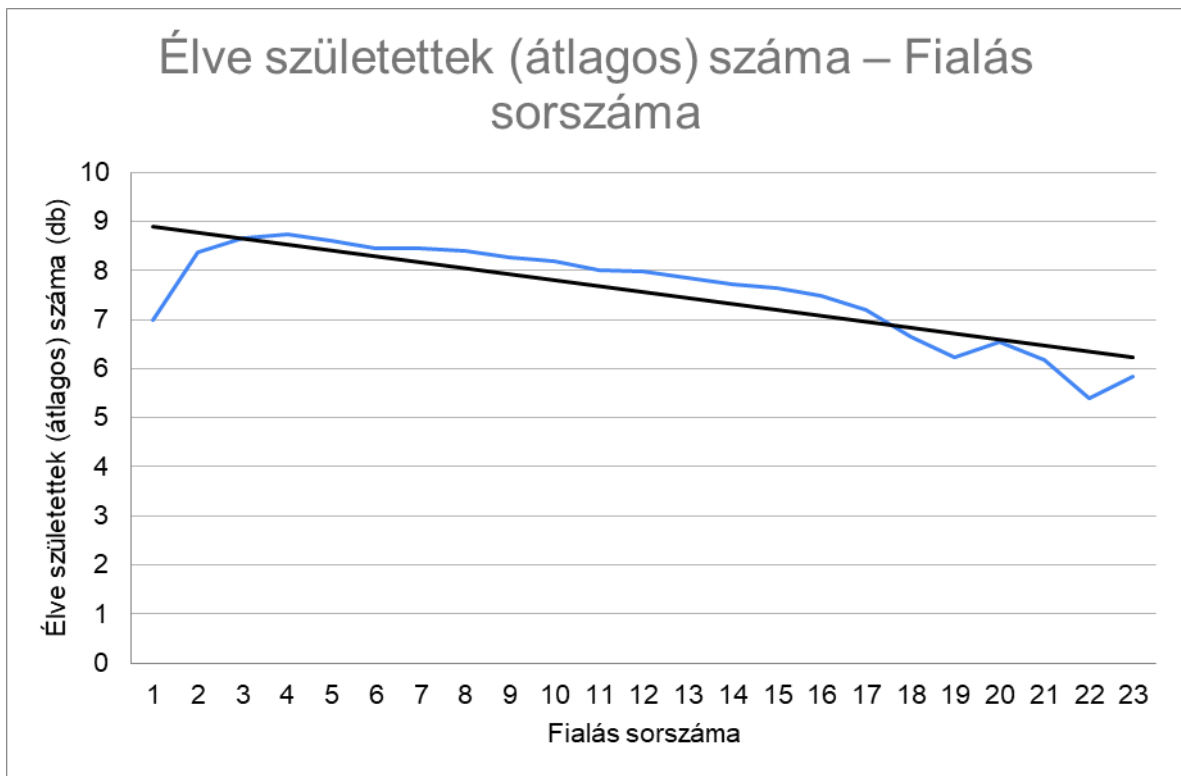
## 6.2 Összehasonlító statisztika

Annak vizsgálata során, hogy egy anyánál a termékenyítés sorszáma és az élve született átlagos utódszám között van-e kapcsolat és ha igen, milyen a kapcsolat iránya, a nullhipotézisem szerint egy anyánál a termékenyítések sorszámanak növekedésével az élve született utódok száma növekszik. Az élve született utódok átlaga 4,97 db (SD=1,03) volt. A szórásdiagram (15. ábra) vizsgálatával, valamint a kovariancia ( $C_{xy} = -6,59$ ) és a korrelációs koefficiens ( $r = -0,81$ ) kiszámításával is csökkenő trendet állapítottam meg. A 95%-os megbízhatósági tartomány ( $MT_{95\%;r} = -0,57; -1,05$ ) nem tartalmazta a nullát, így a trend értelmezhető a termékenyítés sorszáma és az élve születettek átlagos száma közötti kapcsolat bizonyítékeként. Táblázatból kiolvasva, a 25-ös szabadsági fokhoz és az 5%-os döntési küszöbhez tartozó kritikus érték 0,381. Mivel a korrelációs koefficiens értéke ennél nagyobb, ezért elég meggyőzőnek tekinthető a vizsgálat annak bizonyítására, hogy egy anyánál a termékenyítések sorszámanak növekedésével csökken az élve született utódok átlagos száma. Ez az eredmény a nullhipotézist megcáfolja. [45,46,47]



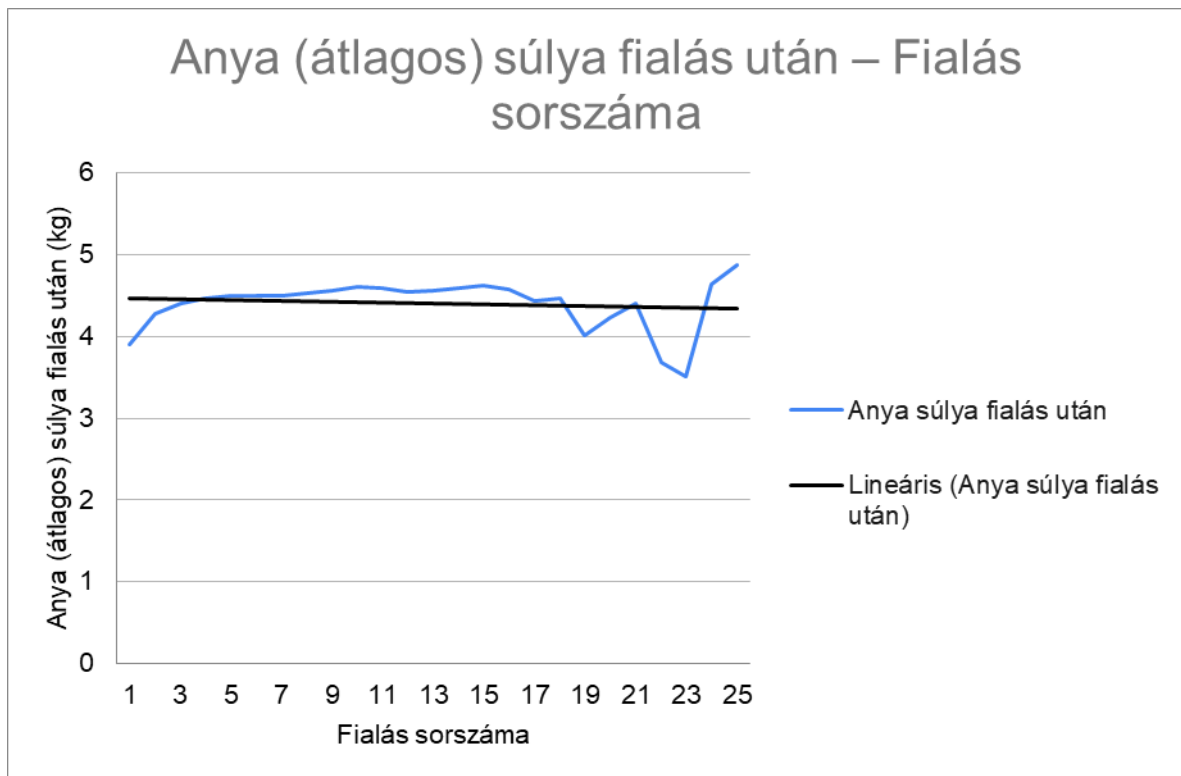
**15. ábra:** Élve született utódszám és a termékenyítés sorszáma közti kapcsolat szórásdiagramja

A fialás sorszáma és az élve született utódok átlagos száma közti összefüggés esetén a nullhipotézis szerint egy anyánál a fialások számának növekedésével az élve született utódok száma is növekszik. Az élve született kisnyulak átlagos száma 7,56 db (SD=0,99) volt. A kovariancia ( $C_{xy} = -5,32$ ) és a korrelációs koefficiens ( $r = -0,79$ ) a szórásdiagrammal (16. ábra) összhangban csökkenő trendet mutat. A 95%-os megbízhatósági tartomány ( $MT_{95\%,r} = -0,51; -1,07$ ) negatív tartományba esik, nullát nem tartalmaz, ezért a trend értelmezhető a vizsgált két paraméter közti kapcsolat bizonyítékeként. Táblázat alapján a 21-es szabadsági fokhoz és 5%-os döntési küszöbhez tartozó kritikus érték 0,41. Mivel az  $r$  érték ennél nagyobb, ezért a vizsgálat egyértelműen bizonyítja, hogy a fialások sorszáma növekedésével az élve születettek átlagos száma csökken. Ebből adódóan az eredmény a nullhipotézist megcáfolja. [45,46,47]



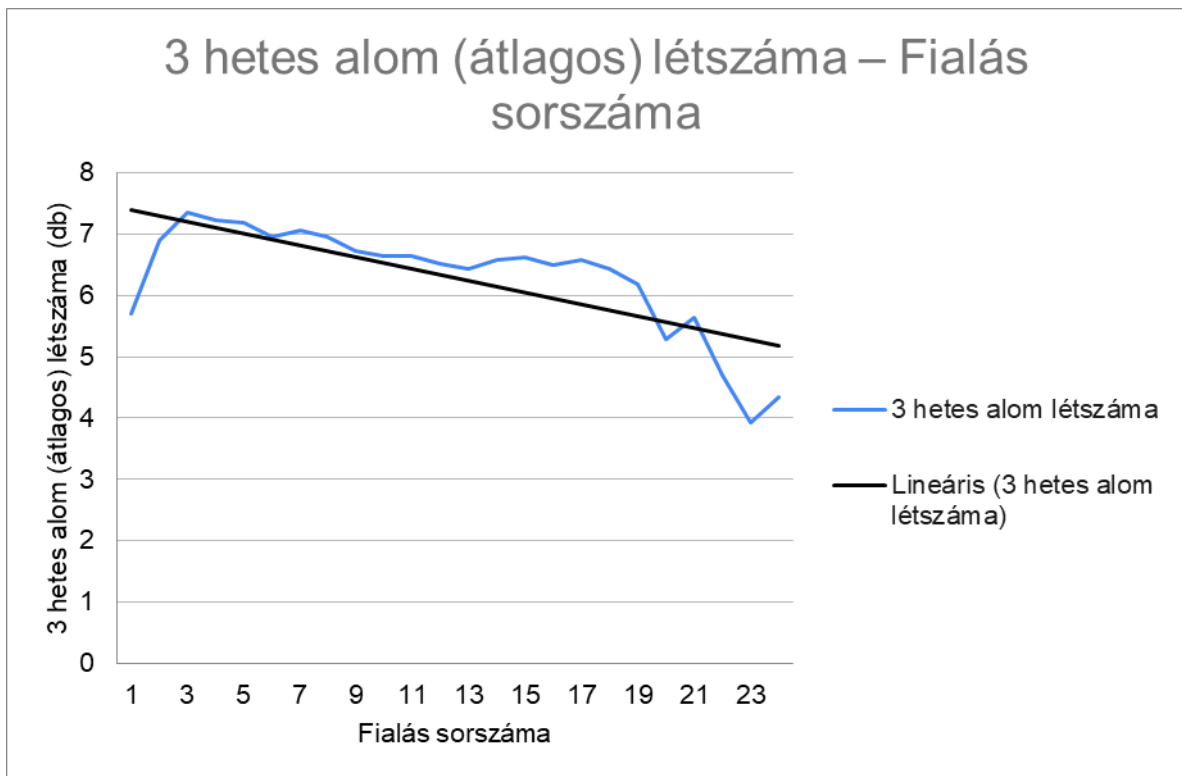
**16. ábra:** Fialás sorszáma és élve született utódszám közti kapcsolat szórásdiagramja

A fialás sorszáma és az anyák fialás utáni átlagos súlya közti kapcsolat vizsgálatakor a nullhipotézis szerint a fialás sorszámanak növekedésével az anyák fialás utáni átlagsúlya növekszik. Az anyák súlyának átlaga 4,39 kg (SD=0,31) volt. A kovariancia ( $C_{xy} = -0,27$ ), a korrelációs koefficiens ( $r = -0,12$ ) és a szórásdiagram (17. ábra) alapján csökkenő trend volt megállapítható, azonban a 95%-os megbízhatósági tartomány ( $MT_{95\%;r} = 0,31; -0,55$ ) tartalmazza a nullát, ezért a trend nem bizonyítja a vizsgált két paraméter közti kapcsolatot. Táblázat alapján a 23-as szabadsági fokhoz és 5%-os döntési küszöbhez tartozó kritikus érték 0,39. Mivel a korrelációs koefficiens értéke ennél kisebb, ezért a vizsgálat nem bizonyítja szignifikánsan, hogy a fialás sorszámanak növekedésével az anyák átlagos súlya a fialás után csökken. Így a nullhipotézis nem bizonyítható, de nem is cáfolható egyértelműen. [45,46,47]



**17. ábra:** Fialás sorszáma és az anyák fialás utáni súlya közti kapcsolat szórásdiagramja

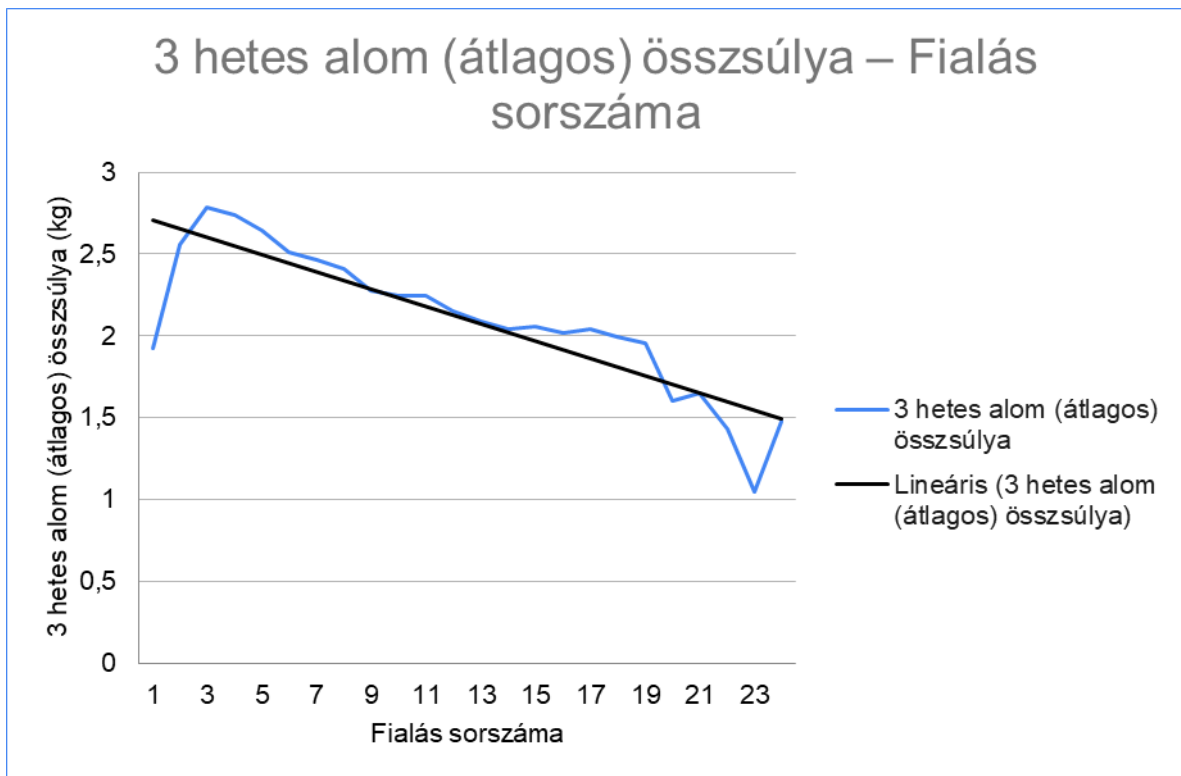
A fialás sorszáma és a 3 hetes alom létszáma közti összefüggés esetén a nullhipotézis alapján minél nagyobb a fialás sorszáma, annál nagyobb a 3 hetes átlagos alomlétszám. Az alomlétszámok átlaga 6,29 db kisnyúl (SD=0,91) volt. A kovariancia ( $C_{xy} = -4,63$ ), a korrelációs koefficiens ( $r = -0,72$ ) és szórásdiagram (18. ábra) csökkenő trendet mutat. A 95%-os megbízhatósági tartomány ( $MT_{95\%;r} = -0,41; -1,02$ ) a nullát nem tartalmazza, ezért a trend bizonyítja a két paraméter közti kapcsolatot. Táblázatból kiolvassa a 22-es szabadsági fokhoz és 5%-os döntési küszöbhez tartozó kritikus érték 0,404. A koefficiens ennél nagyobb értéket mutat, ezért a vizsgálat szignifikánsan bizonyítja, hogy a fialás sorszámanak növekedésével a 3 hetes átlagos alomlétszám csökkenő trendet mutat, ami cáfolja a nullhipotézist. [45,46,47]



**18. ábra:** 3 hetes alomlétszám és a fialás sorszáma közti összefüggés szórásdiagramja

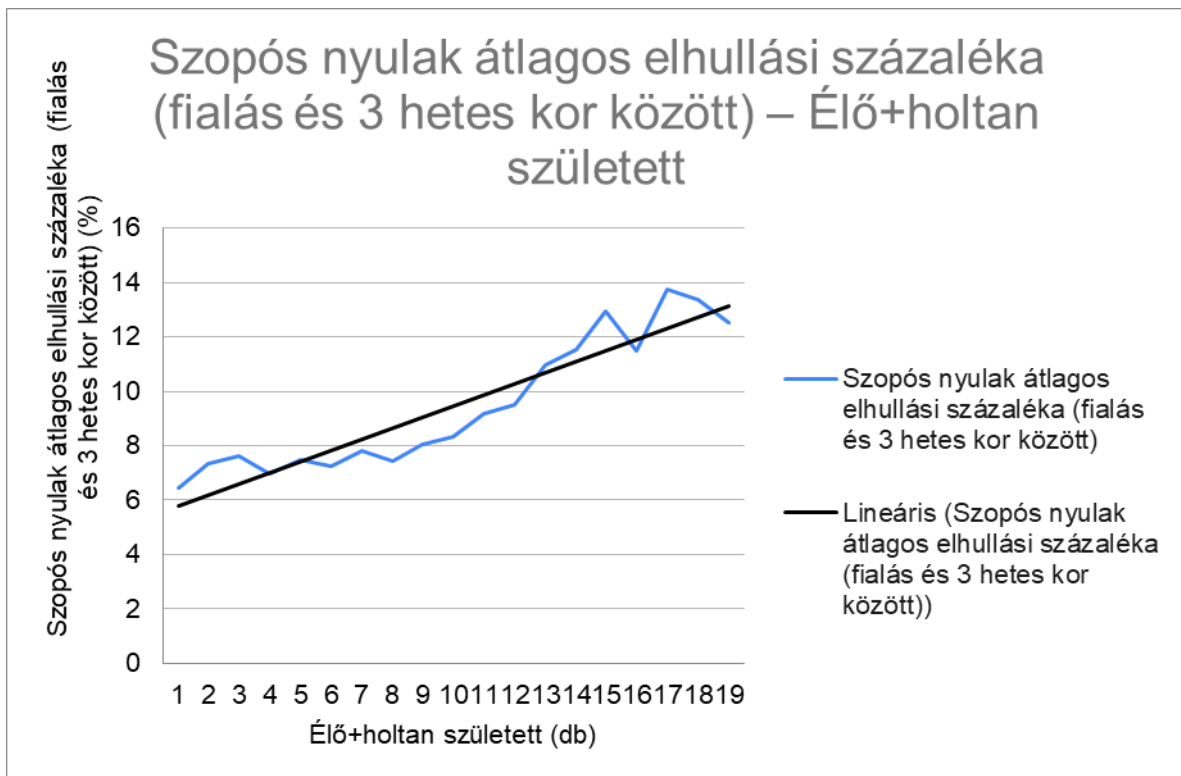
A 3 hetes alom összsúlya és a fialás sorszáma közti összefüggésnél a nullhipotézisem szintén a fialás sorszámának növekedésével együtt növekvő 3 hetes almok összsúlyát feltételezte. Az almok összsúlyának átlaga 2,09 kg (SD= 0,43) volt. A kovariancia ( $C_{xy} = -2,52$ ) a korrelációs koefficienssel ( $r = -0,82$ ) és a szórásdiagrammal (19. ábra) együtt csökkenő trendet mutat. A 95%-os megbízhatósági tartomány ( $MT_{95\%;r} = -0,57; -1,07$ ) nullát nem tartalmaz, ezért a trend értelmezhető a két vizsgált paraméter közti kapcsolat bizonyítékaként. Táblázat alapján a 22-es szabadsági fokhoz és 5%-os döntési küszöbhez tartozó kritikus érték 0,404, ami a koefficiensnél kisebb, ezért egyértelműen bizonyítja a vizsgálat, hogy a fialások sorszámának növekedésével a 3 hetes almok átlagos összsúlya csökkenő trendet mutat, ami a nullhipotézist megcáfolja. [45,46,47]





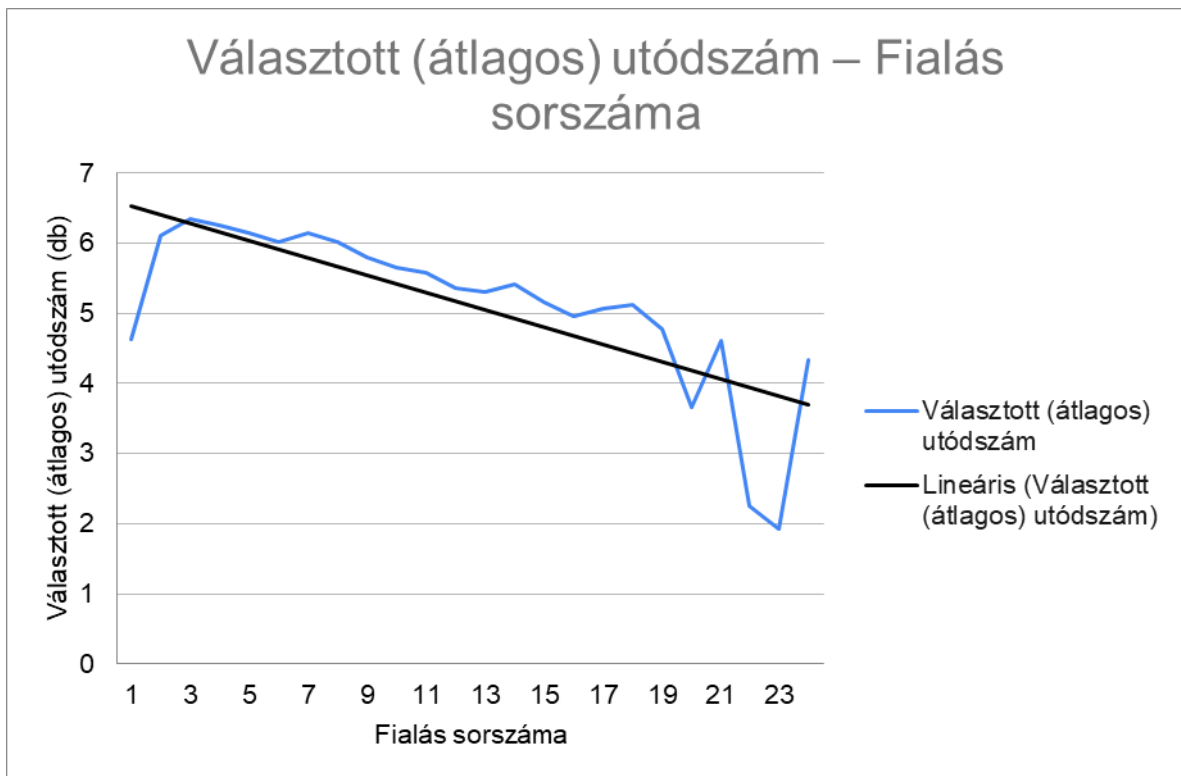
**19. ábra:** A fialás sorszáma és a 3 hetes alom összsúlya közti összefüggés szórásdiagramja

Az alomszám nagysága és a született utódok fialás és 3 hetes kor közötti elhullási százalékának alakulása közti kapcsolat vizsgálata esetén a nullhipotézisem szerint minél nagyobb az alomszám, annál magasabb az elhullási százalék értéke. Az alomszám átlaga 10 db (SD= 5,63), az elhullási százalék átlaga 9,47% (SD= 2,45) volt. A kovariancia ( $C_{xy}=12,23$ ), a korrelációs koefficiens ( $r=0,87$ ) és a szórásdiagram (20. ábra) alapján növekvő trend állapítható meg. A 95%-os megbízhatósági tartomány ( $MT_{95\%,r}=1,12; 0,65$ ) pozitív tartományba esik, nullát nem tartalmaz, így a két vizsgált paraméter közti kapcsolatot a trend bizonyítja. Táblázat alapján a 17-es szabadsági fokhoz és 5%-os döntési küszöbhez tartozó kritikus érték 0,456. A koefficiens nagyobb értéket mutat, ezért szignifikánsnak tekinthető, hogy az alomszám növekedésével a szopós nyulak átlagos elhullási százaléka a fialás és 3 hetes kor között növekvő trendet mutat. Ez alátámasztja az általam feltételezett nullhipotézist. [45,46,47]



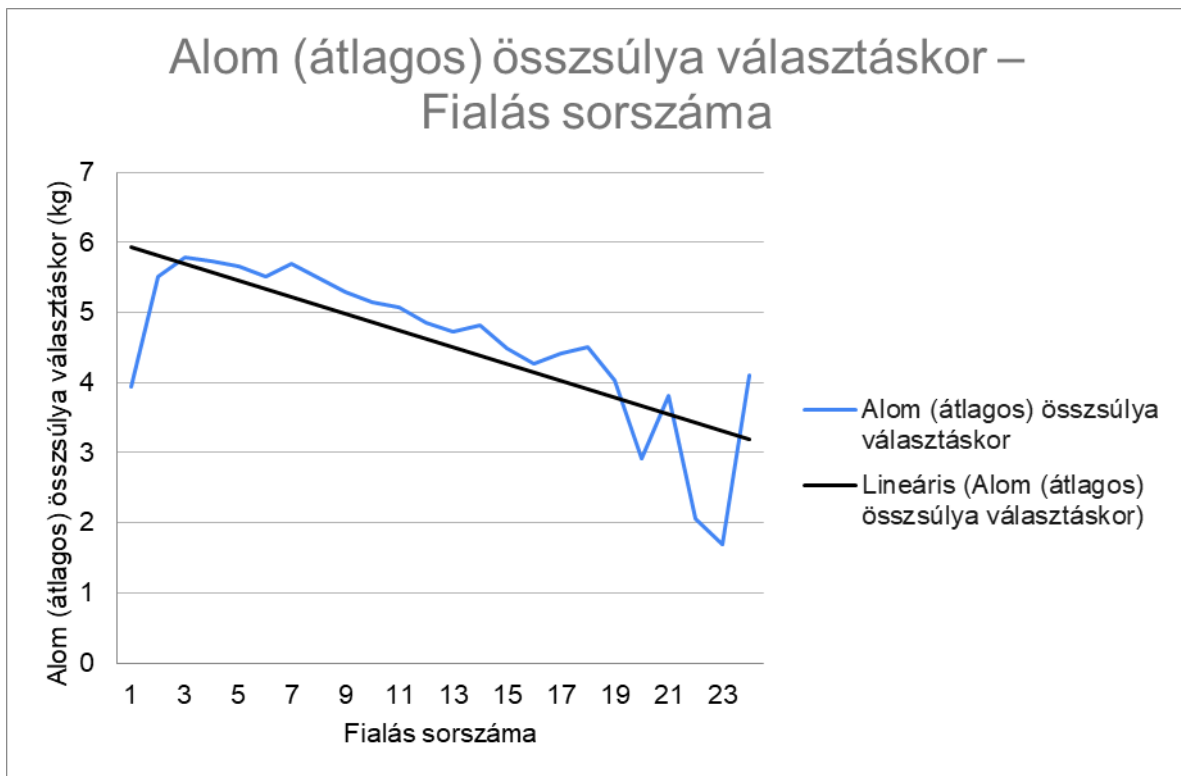
**20. ábra:** Az alomlétszám és az elhullási százalék közti kapcsolat szórásdiagramja

A fialás sorszáma és a választott átlagos utódszám vizsgálata esetén nullhipotézisként azt feltételeztem, hogy minél többedjére fial egy anya, annál magasabb lesz a tőle származó választott utódszám. A választott utódszám átlaga 5,11 db (SD= 1,15) volt. A kovariancia ( $C_{xy} = -5,88$ ), a korrelációs koefficiens ( $r = -0,72$ ) és a szórásdiagram (21. ábra) alapján csökkenő trend állapítható meg. A 95%-os megbízhatósági tartomány ( $MT_{95\%;r} = -0,42; -1,03$ ) nem tartalmazza a nullát, ezért a trend bizonyítja a két vizsgált paraméter közti kapcsolatot. Táblázat alapján a 22-es szabadsági fokhoz és 5%-os döntési küszöbhez tartozó kritikus érték 0,404. Mivel a koefficiens értéke ennél magasabb, így a fialás sorszáma és a választott átlagos utódszám közti csökkenő trend szignifikánsnak tekinthető. Ez az általam feltételezett nullhipotézist megcáfolja. [45,46,47]



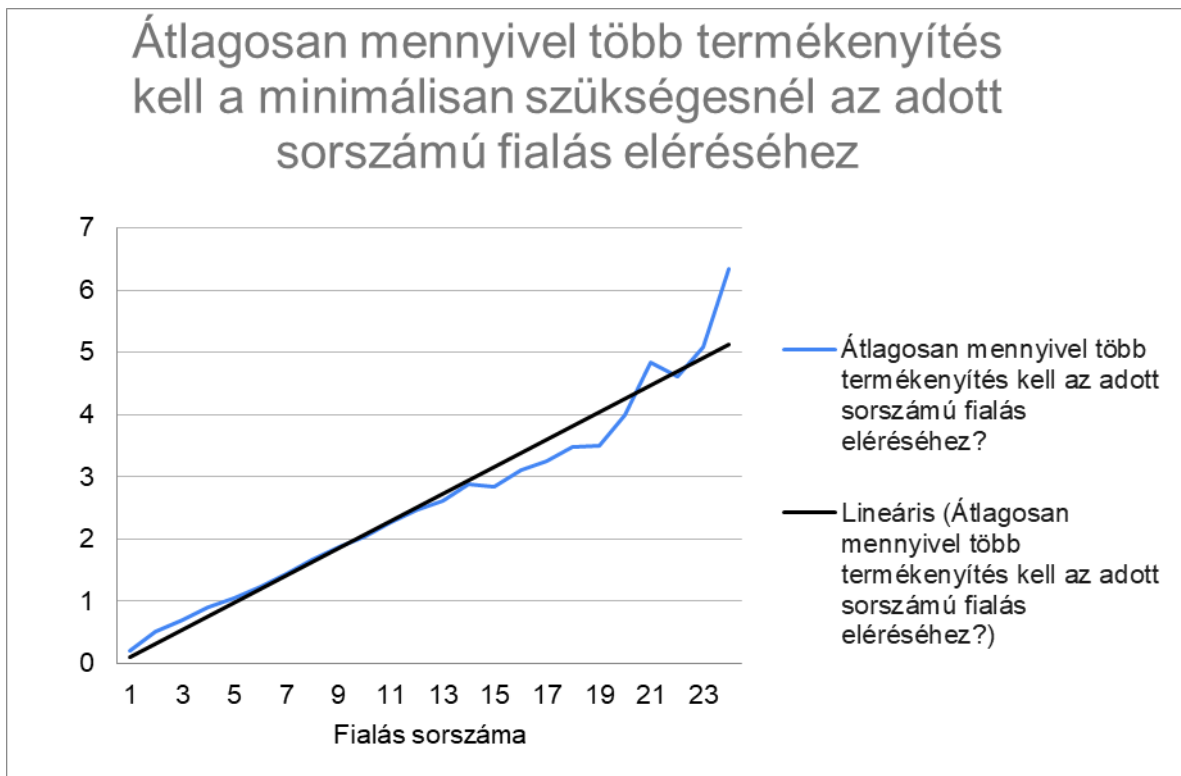
**21. ábra:** A fialás sorszáma és a választott utódszám közti kapcsolat szórásdiagramja

A fialás sorszáma és az alom átlagos választáskori összsúlya közti összefüggés vizsgálata esetében a nullhipotézisem szerint minél többedjére fial egy anya, annál nagyobb lesz az alom átlagos összsúlya választáskor. Az átlagos választáskori alomsúly 4,57 kg (SD=1,11) volt. A kovariancia ( $C_{xy} = -5,72$ ), a korrelációs koefficiens ( $r = -0,73$ ) és a szórásdiagram (22. ábra) alapján a trend csökken. A 95%-os megbízhatósági tartomány ( $MT_{95\%;r} = -0,43; -1,03$ ) nem tartalmazta a nullát, ezért a trend a két vizsgált paraméter közti kapcsolat bizonyítékeként értelmezhető. A 22-es szabadsági fokhoz és 5%-os döntési küszöbhez tartozó kritikus érték 0,404. A koefficiens itt is nagyobb ennél az értéknél, ezért szignifikánsnak tekinthető a fialás sorszáma és az alom átlagos választáskori összsúlya közti csökkenő trend, ami a nullhipotézisemet cáfolja. [45,46,47]



**22. ábra:** Fialás sorszáma és az átlagos választáskori alomsúly közti kapcsolat szórásdiagramja

Annak vizsgálata során, hogy a fialások sorszámának növekedésével átlagosan mennyivel több termékenyítés szükséges az adott sorszámú fialás eléréséhez a minimálisan szükségesnél a nullhipotézisben azt feltételeztem, hogy minél idősebb az anya (tehát minél nagyobb a fialás sorszáma), annál több termékenyítés szükséges az adott sorszámú fialás eléréséhez. A plusz termékenyítések számának átlaga 2,62 db (SD=1,59) volt. A kovariancia ( $C_{xy}=10,48$ ), a korrelációs koefficiens ( $r=0,94$ ) és a szórásdiagram (23. ábra) alapján megállapítható, hogy a vizsgált paraméterek között növekvő trend áll fent. A 95%-os megbízhatósági tartomány ( $MT_{95\%,r}=1,09; 0,78$ ) nem tartalmazta a nullát, ezért a trend a vizsgált paraméterek közti kapcsolat bizonyítékaként értelmezhető. Táblázat alapján 22-es szabadsági fokhoz és az 5%-os döntési küszöbhez tartozó kritikus érték 0,404. A korrelációs koefficiens értéke ennél nagyobb, ezért a fialás sorszáma és a fialás eléréséhez szükséges plusz termékenyítések száma közti növekvő trend szignifikánsnak tekinthető. Ez alátámasztja az általam feltételezett nullhipotézist. [45,46,47]



**23. ábra:** Fialás sorszáma és a plusz termékenyítések közti kapcsolat szórásdiagramja

## 7. Következtetések

A termékenyítések számának évenkénti megoszlásából látszik, hogy 2000-2004 között több volt a termékenyítések száma. Az egy anyára jutó termékenyítések számának évenkénti megoszlása szintén ezt a tendenciát mutatja, 2004-ig ez a szám szintén nagyobb volt, így ez az időszak a termékenyítések tekintetében produktívabbnak tekinthető, mint a 2005-2010 közti időszak. Az évente használt bakok számának alakulásában ellentétes tendencia figyelhető meg. Míg a termékenyítések évi összes száma és az egy anyára jutó száma 2000-2004 között volt magasabb, addig a termékenyítésre, azaz spermagyűjtésre használt bakok száma ebben az időszakban volt alacsonyabb, majd 2005-től látható emelkedés, így 2005-2010 között több bakot használtak. A fialások számának évi megoszlása összhangban van a termékenyítések évenkénti alakulásával, ami arra enged következtetni, hogy az anyák számában, illetve magzatnevelő képességében és/vagy a bakok számában, illetve az általuk termelt sperma mennyiségében és/vagy minőségében nem volt számottevő visszaesés. Az élve születések számának évenkénti alakulásának és a fialások számának évenkénti alakulásának egyezősége megerősíti a következtetést, hogy az anyák magzatnevelő képességében nem volt számottevő visszaesés, valamint arra enged következtetni, hogy a vizsgált időszakban nem volt olyan külső

tényező (például betegség, takarmány túlzott mikotoxin szennyezettsége), ami miatt megnövekedett volna a magzatfelszívódások, vetélések vagy a holtellések száma. Az anyák fialás utáni átlagsúlya kezdetben 4,09 kg volt, majd 2010-re 4,73 kg-ra növekedett, ennek magyarázata az anyák súlyának a kor előrehaladtával történő növekedése, valamint az újonnan tenyésztésbe vett tenyészállatok nagyobb súlya lehet.

A 3 hetes szopós nyulak évenkénti összlétszámának vizsgálata során az évente élve született utódok számához viszonyított kisebb értékek oka a szopós nyulak elhullása a fialás és 3 hetes kor között. A 3 hetes alмок átlagsúlya és a 3 hetes szopós nyulak egyedi súlyának alakulásában látható egy kezdeti csökkenés, majd a 2004-es mélypontot követően ez az érték növekedni kezdett és visszaállt a csökkenést megelőző szintre vagy meghaladta azt. Mivel a 3 hetes nyulak évenkénti összlétszámának tendenciája 2004-ig ezzel ellentétes irányú, ezért a csökkenés oka a várt testtömeggyarapodás elmaradása, aminek többek közt takarmányozási, tartástechnológiai, állategészségügyi vagy genetikai okai lehetnek, azonban ennek megállapítására további vizsgálatokra lenne szükség. A 3 hetes nyulak átlagos elhullási százalékának alakulása összhangban van a 3 hetes szopós nyulak évenkénti összlétszámának tendenciájával, így a 2000-ben és 2001-ben megfigyelhető csúcsok az elhullási százalékban megmagyarázzák a 2000-2002 közötti alacsonyabb 3 hetes szopós nyúl összlétszámot.

Az évente összesen és almonként választott utódszám növekvő tendenciájából arra következtethetünk, hogy a 3 hetes kortól az 5 hetes választásig tartó időszakban nem növekedett az elhullások száma. A választott nyulak évenkénti összsúlyának, illetve a választott alмок súlyának évenkénti alakulása arra utal, hogy 3 és 5 hetes kor között a nyulak testtömeggyarapodását tartósan nem befolyásolta negatívan külső vagy belső tényező.

A termékenyítések sorszámanak és az élve született utódszám közti összefüggés esetében a feltételezett nullhipotézisem szerint egy anyát minél többedjére termékenyítenek, annál nagyobb lesz az élve született utódok száma. Ennek a feltételezésnek az alapja egy Rödel és munkatársai (2004) által végzett vizsgálat volt, melyben egy természetes körülmények közt élő nyúlpopuláció esetében azt találták, hogy az egyéves, első szaporodási szezonban lévő egyedek szaporodási teljesítménye alacsonyabb volt, mint az idősebb nőstényeké, aminek vélhető oka az alacsonyabb testtömeg és a rangsorban elfoglalt alacsonyabb pozíció lehetett.[48] Az általam kapott eredmények szerint azonban minél nagyobb egy anyánál a termékenyítés sorszáma, azaz minél többedjére termékenyítik, annál kisebb lesz az élve születések száma a vizsgált állományban. Ez az összefüggés a fialások számának növekedése esetén is fennáll. Ebből arra lehet következtetni, hogy a kor előrehaladtával és a méh, illetve a női nemi traktus öregedésével

csökken az állatok magzatnevelő képessége. Ebből adódóan, ha egy anyánál a kor előrehaladtával egyre kisebb lesz az élve fialt utódainak száma, akkor a 3 hetes átlagos alomlétszám és a 3 hetes almok átlagos súlya ezzel arányosan szintén csökkenni fog. Ezt a csökkenő trendet tovább erősíti azon vizsgálatok eredménye, melyekben a fialás sorszáma és az átlagos választott utódszám, valamint a választott almok átlagos súlya közti kapcsolatot vizsgáltam. Castellini és munkatársai (2010) tanulmánya alapján ezt a negatív trendet számos tényező okozhatja, többek között az ellési sorrend, a genetika, az alomméret, a szaporodási ritmus vagy a választási kor. Az intenzív laktációs teljesítmény következtében az anyáknál negatív energiamérleg lép fel, továbbá a laktáció és vemhesség közti nagyfokú átfedés következtében energetikai és hormonális antagonizmus lép fel. Mindezen tényezők együttesen csökkentik a termékenységi rátát és az anyák élettartamát. [49]

Feltételeztem, hogy egy anya súlya a fialás után a fialások számának növekedésével növekedni fog annak alapján, hogy a kor előrehaladtával az állat testtömege növekszik a hízás és fejlődés következtében. Azonban a vizsgálat nem volt bizonyító erejű, ezért a nullhipotézist nem tudtam megerősíteni.

Az alomlétszám és a fialástól 3 hetes korig tartó elhullási százalék közti kapcsolat vizsgálatának eredménye megegyezik a Poigner és munkatársai (2000) által kapott eredményekkel. Ebben a tanulmányban szintén Pannon fehér nyulakon végeztek kísérletet és arra a megállapításra jutottak, hogy a születési súly növekedésével és az alomméret csökkenésével csökkent a szopós nyulak mortalitása, továbbá a napi súlygyarapodás és a 10 hetes nyulak súlya jelentős növekedést mutatott. Továbbá megállapították, hogy minél nagyobb a születési súly homogenitása az alomban, annál kisebb a mortalitás mértéke. [50] Ez alátámasztotta a nullhipotézist, mely szerint az alomlétszám növekedésével a szopós nyulak közti elhullási százalék értéke növekedni fog. Ennek okai közt szerepel többek közt a kisebb és fejletlenebb nyulak elegendő mennyiségű tejhez jutásának kisebb esélye, a táplálékért való versengés, az egy nyúlra jutó kevesebb mennyiségű tej, a nagyobb létszám miatti zsúfoltság, a fertőző betegségek könnyebb terjedése. Ezen probléma mértékének enyhítésének egyik lehetséges eszköze az alomkiegyenlítés, az almok homogenizálása.

Annak vizsgálata során, melyben arra kerestem a választ, hogy átlagosan mennyivel több termékenyítés szükséges az adott sorszámú fialás eléréséhez, az általam feltételezett nullhipotézis szerint minél idősebb az anya (minél nagyobb a fialás sorszáma), annál több termékenyítés szükséges. A vizsgálat eredménye egyértelműen alátámasztotta ezen feltételezést, melynek alapja egy Castellini (2007) által írt tanulmány volt, melyben leírja, hogy

a fentebb is említett negatív energiamérleg, a laktáció és vemhesség közti átfedésből eredő hormonális és energetikai antagonizmus, az állatjólléti problémák, a rosszabb egészségi státusz, az alomméret növekedése, és a szaporodási ritmus negatívan befolyásolják az anyák termékenységet. [51]

## **8. Összefoglalás**

A vizsgált telepről elmondható a leíró statisztikai elemzés alapján, hogy a termékenyítések számában kezdeti növekedés után visszaesés volt tapasztalható, míg a termékenyítésre használt bakok száma növekedett. Az évi fialásszámok és az élve születések száma hasonló tendenciát mutatott. Az anyák fialás utáni súlya növekedett az évek előrehaladtával. A 3 hetes szopós nyulak évi száma növekedés után stagnált, míg ezen nyulak egyedi súlya és az almok súlya a kezdeti csökkenést követően egy mélypont elérése után visszaállt az eredeti szintre. A fialás és 3 hetes kor közötti elhullások száma csökkenő tendenciát mutatott, ami megmagyarázza a 3 hetes összlétszámokat. A választott nyulak száma és összsúlya növekedett az évek során.

Az összehasonlító statisztikai elemzések során az általam feltételezett nullhipotézisek nagy része cáfolva lett. A termékenyítések sorszámának növekedésével és a fialások számának növekedésével, így az anya öregedésével csökken az élve született utódok száma. Az egy anyától származó 3 hetes alom létszáma és összsúlya a fialások számának növekedésével csökken, ami vélhetően szintén az öregedés következménye. Az alomszám növekedésével az elhullások száma egyenletesen növekszik. A kor előrehaladtával az egy anyától származó választott nyulak száma, valamint a választott almok súlya is csökken, viszont a fialások számának növekedésével egy adott sorszámú fialás eléréséhez átlagosan egyre több termékenyítés szükséges. Ezek alapján elmondható, hogy az anyák öregedésével arányosan csökken a vemhesülési arányuk és a magzatnevelő képességük, valamint a megszületett utódok száma és súlya is arányosan csökken, illetve a nagyobb alomlétszám nagyobb elhullási aránnyal jár. Ezen problémák mérsékelhetők új nőtény nyulak tenyésztésbe állítása által a folyamatos tenyész-utánpótlással, valamint az alomkiegyenlítéssel csökkenthető a szopós nyulak közti elhullások száma.



## 9. Irodalomjegyzék

1. Bleyer F, Szendrő Zs (1999) A nyúltenyésztés helyzete Magyarországon. PATE Kaposvár Állattudományi Kar, Kisállattenyésztési Tanszék, Tanulmány 6–7
2. Szendrő K (2022) A nyúlhús fogyasztás helyzete és alakulása. *Állattenyésztés és takarmányozás* 71(2022) 185
3. Dalle Zotte A, Szendrő Zs (2011) The role of rabbit meat as functional food. *Meat Science* 88:319–331. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2011.02.017>
4. Bogó Zs (2013) Ökológiai szemléletű nyúltenyésztés és bionyúlhús előállítás. Szakdolgozat, Szent István Egyetem Állatorvos-tudományi Kar Állattenyésztési, Takarmányozástani és Laborállat-tudományi Intézet Állattenyésztési és Genetikai Osztály, Budapest
5. Brewer NR (2006) Historical Special Topic Overview on Rabbit Comparative Biology Biology of the Rabbit. *J Am Assoc Lab Anim Sci* 45:8–24
6. Adams CE (1970) The development of rabbit eggs after culture in vitro for 1-4 days. *Development* 23:21–34. <https://doi.org/10.1242/dev.23.1.21>
7. Zöldág L, Gáspárdy A, Maróti-Agóts Á, Seregi J (2018) Állatorvosi genetika és állattenyésztéstan. Állatorvostudományi Egyetem, Budapest
8. Peaker M, Taylor JC (1975) Milk secretion in the rabbit: changes during lactation and the mechanism of ion transport. *The Journal of Physiology* 253:527–545. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1975.sp011205>
9. Lebas F, Scheller M-C, Sardi G (1971) Composition chimique du lait de lapine, évolution au cours de la traite et en fonction du stade de lactation. In: *Annales de zootechnie*. pp 185–191
10. Tarvydas H, Jordan SM, Morgan EH (1968) Iron metabolism during lactation in the rabbit. *British Journal of Nutrition* 22:565–573. <https://doi.org/10.1079/BJN19680066>
11. Hansen PJ (2014) Current and Future Assisted Reproductive Technologies for Mammalian Farm Animals. In: Lamb GC, DiLorenzo N (eds) *Current and Future Reproductive Technologies and World Food Production*. Springer, New York, NY, pp 1–22
12. Hansen PJ (2013) Prospects for use of embryo transfer for genetic selection and fertility improvement in cattle. *CATTLE PRACTICE* 21:30–34
13. Moore K, Thatcher WW (2006) Major Advances Associated with Reproduction in Dairy Cattle. *Journal of Dairy Science* 89:1254–1266. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(06\)72194-4](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(06)72194-4)

14. Godke RA, Sansinena M, Youngs CR (2014) 22 - Assisted Reproductive Technologies and Embryo Culture Methods for Farm Animals. In: Pinkert CA (ed) *Transgenic Animal Technology* (Third Edition). Elsevier, London, pp 581–638  
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-410490-7.00022-0>
15. Harris GW, Marshall FHA (1997) The induction of ovulation in the rabbit, by electrical stimulation of the hypothalamo-hypophysial mechanism. *Proceedings of the Royal Society of London Series B - Biological Sciences* 122:374–394. <https://doi.org/10.1098/rspb.1937.0031>
16. Bakker J, Baum MJ (2000) Neuroendocrine Regulation of GnRH Release in Induced Ovulators. *Frontiers in Neuroendocrinology* 21:220–262. <https://doi.org/10.1006/frne.2000.0198>
17. García M-L (2018) Embryo manipulation techniques in the rabbit. *New Insights into Theriogenology*, 1st ed; Payan-Carreira, R, Ed 113–133
18. Cortell C, Salvetti P, Joly T, Viudes-de-Castro MP (2015) Effect of different superovulation stimulation protocols on adenosine triphosphate concentration in rabbit oocytes. *Zygote* 23:507–513. <https://doi.org/10.1017/S0967199414000112>
19. García ML, Blasco A, Argente MJ (2016) Embryologic changes in rabbit lines selected for litter size variability. *Theriogenology* 86:1247–1250. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.04.065>
20. Saenz-de-Juano MD, Naturil-Alfonso C, Vicente JS, Marco-Jiménez F (2013) Effect of different culture systems on mRNA expression in developing rabbit embryos. *Zygote* 21:103–109. <https://doi.org/10.1017/S0967199411000414>
21. Marco-Jiménez F, Lavara R, Jiménez-Trigos E, Vicente JS (2013) In vivo development of vitrified rabbit embryos: Effects of vitrification device, recipient genotype, and asynchrony. *Theriogenology* 79:1124–1129. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2013.02.008>
22. Al-Hasani S, Trotnow S, Sadtler C, Hahn J (1986) In vitro fertilization and embryo transfer of pre-ovulatory rabbit oocytes. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology* 21:187–195. [https://doi.org/10.1016/0028-2243\(86\)90035-3](https://doi.org/10.1016/0028-2243(86)90035-3)
23. Lan C, Xiaohui D, Qingzhao F, Anran X, Chun-yan H, Hongling Y, Xuan Y (2008) Developmental potential of oocytes fertilized by conventional in vitro fertilization (IVF) or intracytoplasmic sperm injection (ICSI) after cryopreservation and mesometrial autotransplantation of rabbit ovarian tissue. *Animal* 2:1371–1376. <https://doi.org/10.1017/S1751731108002528>
24. Intawicha P, Siriboon C, Chen C-H, Chiu Y-T, Lin T-A, Kere M, Lo N-W, Lee K-H, Chang L-Y, Chiang H-I, Ju J-C (2016) Derivation and characterization of putative embryonic stem cells from cloned rabbit embryos. *Theriogenology* 86:1799–1810. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.05.035>

25. Vicente JS, Viudes-de-Castro MP, García ML (1999) In vivo survival rate of rabbit morulae after vitrification in a medium without serum protein. *Reprod Nutr Dev* 39:657–662. <https://doi.org/10.1051/rnd:19990511>
26. Soliman F, El-Sabroun K (2020) Artificial insemination in rabbits: factors that interfere in assessing its results. *Journal of Animal Behaviour and Biometeorology* 8:120–130 <http://dx.doi.org/10.31893/jabb.20016>
27. Szendrő Zs, Szendrő K, Zotte AD (2012) Management of Reproduction on Small, Medium and Large Rabbit Farms: A Review. *Asian-Australas J Anim Sci* 25:738–748. <https://doi.org/10.5713/ajas.2012.12015>
28. Castellini C (2008) Semen production and management of rabbit bucks. In: 9th World Rabbit Congress. pp 10–13
29. Boiti C, Castellini C, Besenfelder U, Theau-Clément M, Liguori L, Renieri T, Pizzi F (2005) Guidelines for handling of rabbit bucks and semen. *World Rabbit Science* 13:71–91 <https://dx.doi.org/10.4995/wrs>
30. Daniel N, Renard J-P (2010) Artificial Insemination in Rabbits. *Cold Spring Harb Protoc* 2010:pdb.prot5358. <https://doi.org/10.1101/pdb.prot5358>
31. Kuzminsky G, Fausto AM, Morera P (1996) Morphological abnormalities of rabbit spermatozoa studied by scanning electron microscope and quantified by light microscope. *Reproduction Nutrition Development* 36:565–575
32. Minelli A, Moroni M, Castellini C (2001) Isolation and purification of the IGF-I protein complex from rabbit seminal plasma: Effects on sperm motility and viability. *Journal of Experimental Zoology* 290:279–290. <https://doi.org/10.1002/jez.1058>
33. Nishijima K, Kitajima S, Matsuhisa F, Niimi M, Wang C, Fan J (2021) Strategies for Highly Efficient Rabbit Sperm Cryopreservation. *Animals (Basel)* 11:1220. <https://doi.org/10.3390/ani11051220>
34. Hanada A, Nagase H (1980) Cryoprotective effects of some amides on rabbit spermatozoa. *Reproduction* 60:247–252. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0600247>
35. Kashiwazaki N, Okuda Y, Seita Y, Hisamatsu S, Sonoki S, Shino M, Masaoka T, Inomata T (2006) Comparison of Glycerol, Lactamide, Acetamide and Dimethylsulfoxide as Cryoprotectants of Japanese White Rabbit Spermatozoa. *Journal of Reproduction and Development* 52:511–516. <https://doi.org/10.1262/jrd.18008>
36. Tekin K, Daşkın A (2019) Effect of polyvinyl alcohol on survival and function of angora buck spermatozoa following cryopreservation. *Cryobiology* 89:60–67. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2019.05.004>
37. Simione F (1992) Key Issues Relating to the Genetic Stability and Preservation of Cells and Cell Banks. *PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology* 46:226–232

38. Koshimoto C, Mazur P (2002) Effects of warming rate, temperature, and antifreeze proteins on the survival of mouse spermatozoa frozen at an optimal rate. *Cryobiology* 45:49–59. [https://doi.org/10.1016/S0011-2240\(02\)00105-0](https://doi.org/10.1016/S0011-2240(02)00105-0)
39. Morrell JM (1995) Artificial insemination in rabbits. *British Veterinary Journal* 151:477–488
40. El-Gayar M, Khalil H, Hanafy A, Yaseen M, Hegaze E, Marthold D, Gauly M, Holtz W (2014) Pregnancy detection in rabbits by ultrasonography as compared to manual palpation. *Egyptian Journal of Animal Production* 51:196–199
41. Morrell JM (1990) Use of an ELISA for plasma progesterone to facilitate rabbit husbandry. *Vet Rec* 127:521–524
42. Johnke D, de Graaf SP, Bathgate R (2014) Investigation of in vitro parameters and in vivo fertility of rabbit spermatozoa after chilled storage. *Animal Reproduction Science* 147:135–143. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2014.04.014>
43. Fischer B, Chavatte-Palmer P, Viebahn C, Navarrete Santos A, Duranthon V (2012) Rabbit as a reproductive model for human health. *Reproduction* 144:1–10. <https://doi.org/10.1530/REP-12-0091>
44. Herrler A, Beier HM (2000) Early embryonic coats: morphology, function, practical applications. An overview. *Cells Tissues Organs* 166:233–246. <https://doi.org/10.1159/000016736>
45. Sándor J, Ádány R (2011) *Biostatistika*. Medicina Könyvkiadó Zrt., Budapest
46. Fazekas I (2011) Valószínűségszámítás és statisztika 7.7. 7.7. Táblázatok. Elektronikus jegyzet <https://gyires.inf.unideb.hu/KMITT/b21/ch07s07.html>
47. Siegle D (2015) Critical Values of the Correlation Coefficient. <https://web.archive.org/web/20150308223034/http://www.gifted.uconn.edu/siegle/research/Correlation/corrchrt.htm>. Accessed 23 Oct 2023
48. G. Rödel H, Bora A, Kaiser J, Kaetzke P, Khaschei M, Von Holst D (2004) Density-dependent reproduction in the European rabbit: a consequence of individual response and age-dependent reproductive performance. *Oikos* 104:529–539. <https://doi.org/10.1111/j.0030-1299.2004.12691.x>
49. Castellini C, Dal Bosco A, Arias-Álvarez M, Lorenzo PL, Cardinali R, Rebollar PG (2010) The main factors affecting the reproductive performance of rabbit does: A review. *Animal Reproduction Science* 122:174–182. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2010.10.003>
50. Poigner J, Szendrő Zs, Lévai A, Radnai I, Biró-Németh E (2000) Effect of birth weight and litter size on growth and mortality in rabbits. *World Rabbit Science* 8:17–22. <https://doi.org/10.4995/wrs.2000.413>

51. Castellini C (2007) Reproductive activity and welfare of rabbit does. Italian Journal of Animal Science 6:743–747. <https://doi.org/10.4081/ijas.2007.1s.743>

## **10. Köszönetnyilvánítás**

Ezúton szeretnék köszönetet mondani Dr. Horváth András témavezetőmnek, aki folyamatos segítségnyújtásával és rugalmasságával hozzájárult szakdolgozatom létrejöttéhez.

Szeretném megköszönni Dr. Göcző Ágoston segítségét az adatok gyűjtésében.

Továbbá szeretném megköszönni barátaimnak, akik a szakdolgozatom megírásában támogattak.