SZENT ISTVÁN EGYETEM

MATERNÁLIS STRESSZ VIZSGÁLATOK TŐKÉS RÉCÉN

Doktori (PhD) értekezés

FERENCZINÉ SZŐKE ZSUZSANNA

Gödöllő

2008

A doktori iskola

megnevezése: Állattenyésztés-tudományi Doktori Iskola

tudományága: Mezőgazdaságtudomány

vezetője: Prof. Dr. Mézes Miklós, D.Sc.
tanszékvezető, egyetemi tanár, az MTA doktora
Szent István Egyetem, Gödöllő, Mezőgazdasági- és Környezettudományi Kar,
Takarmányozástani Tanszék

Témavezető: Prof. Dr. Péczely Péter, D.Sc.
egyetemi tanár, az MTA doktora
Szent István Egyetem, Gödöllő, Mezőgazdasági- és Környezettudományi Kar,
Szaporodásbiológiai Laboratórium

....

Prof. Dr. Mézes Miklós
A programvezető jóváhagyása

Prof. Dr. Péczely Péter
A témavezető jóváhagyása

TARTALOMJEGYZÉK

1. BEVEZETÉS 1.
1.1 Célkitűzések 2.

2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS 3.
2.1. A stressz hatása az utódokra 3.
2.1.1. A maternális stresszhatások emlősökben 4.
2.1.2. A maternális stresszhatások halakban és hüllőkben 6.

2.2. Tojásszikbe deponált szteroidok 6.
2.2.1. Szikbe deponált androgének szerepe 8.
2.2.2. 17-β-ösztradiol (E2) allokáció hatásai az utódokra 12.
2.2.3. Progeszteron (P4) allokáció hatásai az utódokra 13.
2.2.4. Dehidro-epiandroszteron (DHEA) hatásai az utódokra 13.
2.2.5. Kortikoszteron (B) allokáció hatásai az utódokra 14.

2.3. Tojásméret változásai 16.
2.3.1. A stresszhatások és a tojásméret interrelációja 17.

2.4. A szikbe deponált szteroidok ivararányt befolyásoló hatásai 18.

3. ANYAG ÉS MÓDSZER 21.
3.1. Kísérleti állatok és tartásuk 21.

3.2. Kísérleti protokollok 21.
3.2.1. 2002-es, első évi maternális stresszkezelések (nagyszülő állomány) 21.
3.2.1.1. Handling stressz kivitelezése 21.
3.2.1.2. Éter stressz kivitelezése 22.
3.2.2. 2003-as, második évi stresszkezelések, ahol az F1 generáció a szülőállomány 23.

3.3. Tojásszik analízis metodikai fejlesztések 24.
3.3.1. Direkt dietil-éteres extrakció 24.
3.3.2. Direkt petroléter/dietil-éteres extrakció 24.
3.3.3. Dietil-éter extrakció SDS-es emulzifikációval kiegészítve 25.
3.3.4. Dietil-éter extrakció Triton-X-100-as emulzifikációval kiegészítve 25.
3.3.5. Petroléter/dietil-éteres extrakció SDS-es emulzifikációval kiegészítve 25.
3.3.6. Petroléter/dietil-éteres extrakció Triton-X-100-as emulzifikációval kiegészítve 25.

3.4 Tojás-biopszia vizsgálat 25.

3.5 Fekális szteroid analízis metodikai fejlesztések 26.
3.5.1. Tesztoszteron terhelés hatása a defekációra 26.
3.5.1.1. Takarmány-áthaladás vizsgálatok 26.
3.5.1.2. Tesztoszteron terhelés 27.

3.6. A 84 órás inkubálás után embrionális szövetminta és tojásszik-minták gyűjtése 27.

3.7. Szexuálszteroidok és kortikoszteron mennyiségi meghatározása ^{3}H-RIA módszerrel 27.
3.7.1.A meghatározás plazmából, mintavétel 28.
3.7.2. Meghatározás bélsármintákból, mintavétel 28.
3.7.3. Meghatározás szikmintákból 28.
3.7.4. RIA kivitelezése 29.

3.8. A genetikai ivarmeghatározás menete 31.

3.9. Statisztikai analízis 32.

4. EREDMÉNYEK 33.
4.1. Tojásszik analízis metodikai fejlesztések, metodika kiválasztás 33.

4.2. A szik szteroid tartalmának változásai az inkubáció első nyolc napjában 38.

4.3. A faeces képződés kinetikája intakt állatokban. A plazma-bélsár fázis eltolódás tesztoszteron terhelés hatására 40.
4.3.1. A takarmány-áthaladás az őszi posztrefrakter- szexuális inaktív- időszak alatt 40.
4.3.2. A takarmány-áthaladás a reprodukciós időszakban 40.
4.3.3 Tesztoszteron terhelés 41.

4.4. Maternális stressz vizsgálatok 47.
4.4.1. Handling stressz vizsgálatok az első évben, nagyszülő generáció 47.
4.4.2. Éter-stressz vizsgálatok az első évben, nagyszülő állomány 61.

4.5. 2003. évi stressz vizsgálatok az F1 (szülő) generáción 73.
4.5.1. Handling stressz vizsgálatok az F1 generációban 75.
4.5.1.1. A handling stressz hatása az F2 generáció embrionális fejlődésre 77.
4.5.1.2. Szteroid vizsgálatok 79.
4.5.1.2.1. Kortikoszteron eredmények 79.
4.5.1.2.2. Tesztoszteron koncentráció eredmények 82.
4.5.1.2.3. Dehidro-epiandroszteron koncentráció eredmények 83.
4.5.1.2.4. 17- β -ösztradiol koncentráció eredmények 85.
4.5.1.2.5. Progeszteron koncentráció eredmények 86.
4.5.2. Éter stressz vizsgálatok az F1 generációban 88.
4.5.2.1. Az éter stressz hatása az F2 generáció embrionális fejlődésre 90.
4.5.2.2. Szteroid vizsgálatok 91.
4.5.2.2.1. Kortikoszteron eredmények 91.
4.5.2.2.2. Tesztoszteron koncentráció eredmények 94.
4.5.2.2.3. Dehidro-epiandroszteron koncentráció eredmények 95.
4.5.2.2.4. 17- β -ösztradiol koncentráció eredmények 97.
4.5.2.2.5. Progeszteron koncentráció eredmények 98.

4.6. Új tudományos eredmények 100.

5. KÖVETKEZTETÉSEK ÉS JAVASLATOK 101.
5.1. Metodikai fejlesztés a tojásszik szteroid analízisében 101.

5.2 Tojás biopszia vizsgálatok 102.

5.3. A faeces képződés kinetikája intakt állatokban. A plazma-bélsár fázis eltolódás tesztoszteron terhelés hatására 104.

5.4. Maternális stresszhatás a tojástermelésre, szteroid allokációra és az utódokra 107.

6. ÖSSZEFOGLALÁS 117.

7. SUMMARY 121.

8. AZ ÉRTEKEZÉS TÉMAKÖRÉHEZ KAPCSOLÓDÓ PUBLIKÁCIÓK 125.

9. FELHASZNÁLT IRODALOM 127.

10. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS 135.

RÖVIDÍTÉSI JEGYZÉK

Δ^5-3β-HSD: Δ^5-3β-hidroxyszteroid-dehidrogenáz

A4: androszténdion

ACTH: adrenokortikotróp hormon

ANOVA: variancia-analízis

B: kortikoszteron

BWE (Blastoderm without embryo): embrió nélküli blasztoderma

CPM: counts per minute (becsapódás/perc)

CRF: corticotrop realising factor

DHEA: dehidro-epiandroszteron

DHEA-S: dehidro-epiandroszteron- szulfát

DHT: dihidro-tesztoszteron

E_2: 17-β-ösztradiol

i.p.: intraperitoneális beadás

NS (non significant): nem szignifikáns

P (parents): szülőállomány

PD (positive development): differenciálatlan embrionális szövet

P4: progeszteron

RIA radioimmunoassay

SDS: Sodium-dodecyl-sulphate

T: tesztoszteron

v%: térfogatszázalék

w/v %: vegyesszázalék

1. BEVEZETÉS

Az emlős embrió kialakulására, illetve az utód életképességére kétféleképpen hatnak a szülői információk. Egyrészt az öröklött tulajdonságok megjelennek az utód genotípusában, másrészt az embriogenezis során és posztnatalisan a környezeti hatások epigenetikus módon jelentősen módosíthatják a fenotípus megjelenését és differenciálódását. Az epigenetikus faktorok kifejeződése az egyedfejlődés során egyben adaptációt is jelent, mely az életben maradás egyik fontos tényezője. Az emlős embrió fejlődése során a környezet fogalmába tartozik a placentán átáramló információtömeg is, melynek egyik nagyon fontos meghatározó részét hormonok képezik. A placenta teljes mértékben átjárható a maternális szteroidok számára, az embriogenezis korábbi fázisában a feto-maternális szteroid egyensúly, majd később a szűkebb értelemben vett feto-placentális hormonális miliő lesz meghatározó az embrió kialakulására. Emellett emlősökben (ikerellők és multiparák) fontos szabályzó hatása van az egymás mellett fejlődő embriók ivarának, például, jól ismert, hogy a két hím embrió közé „ékelődött" nőstény egyed nőivari jellege gyengébb megjelenést mutat (Becze, 1981). Mindezek a megállapítások arra utalnak, hogy módosító lehetőségek vannak az embriófejlődés során a fejlődés és az ivari jelleg manifesztációjának befolyásolására.

Madarak – illetve ovipara állatok - vonatkozásában sokáig általánosan elfogadott volt az, hogy az utódra gyakorolt „szülői hatásokat" csupán a genetikai információátadás jelenti és „normális összetételű" tojás esetében egészséges utódra számíthatunk. Ez más szóval azt jelentené, hogy az emlősöknél igazolt epigenetikus, intrauterinális hatások az ovipara madárban nem jelennek meg. Ebben az elméletben hozott alapvető áttörést Schwabl (1993) munkája, aki megállapította, hogy a tojássárgájában Radio Immuno Assay-vel jól mérhető mennyiségű szexuálszteroidok és kortikoszteron találhatók. Ezek mennyisége változónak bizonyult, mivel a kanári tojásaiban a tesztoszteron mennyiség fokozatosan nőtt a lerakott tojások számával. A feltevés szerint a növekvő szteroid koncentráció kompenzálja a később lerakott tojás „hátrányosabb" helyzetét: a szik tesztoszteron tartalom és a kikelt fiókák agresszivitása és életrevalósága között határozott pozitív összefüggés volt kimutatható (Schwabl et al., 1996).

Valószínűsíthető, hogy a tojó képes befolyásolni a tojásszik szteroid tartalmát, pl. annak megfelelően, hogy a számára attraktívabb hímmel párosodik, vagy sem. Amennyiben egy domináns és „vonzó" hím lesz a párja akkor, pl. a tőkés réce esetében nagyobb méretű tojások rakása megfigyelhető (Cunningham és Russel, 2000), emellett a tojás szikanyagában jóval magasabb koncentrációban jelennek meg az androgének. Természetesen a nagyobb tojásba több nutritív anyag is kerül, ez is elősegítheti az utód nagyobb rátermettségét, jobb túlélési esélyét. Zebrapintyek esetében figyelték meg, hogy attraktív hímmel való párosodást követően a lerakott tojásokban

magasabb androgén-koncentráció volt mérhető (Gil et al., 1999). Az utódok ivarmegoszlását is érintheti az irányított szexuál szteroid depozíció, mert ha több androgén kerül a tojás szikanyagába, akkor ez befolyásolhatja, hogy az első poláros testbe Z vagy W ivari kromoszóma fog kerülni (Petrie et al., 2001).

Ez a néhány ismert adat arra utal, hogy madarak esetében is fennáll az utód maternális eredetű epigenetikus „befolyásolásának" lehetősége, sőt nem kizárt az, hogy a tojásszám modulációja, illetve a fészekalj egy részének sokszor nehezen megmagyarázható pusztulása arra lenne visszavezethető, hogy a tojó egyfajta adaptációs stratégiát alkalmazva befolyásolni képes az utódszámot és ezen keresztül egy teljes populáció életben maradásának esélyeit (Sasvári et al., 1999; 2001).

A tojómadarat ért kedvezőtlen (környezeti) hatások – valamint ezek fennmaradásának valószínűsége – fontossá teszik az utód anyagcseréjének adaptív szempontú felkészítését, ill. áthangolását. Ez csakis „rugalmas", gyorsan megváltoztatható, epigenetikus információ átadással valósulhat meg. Milyen stratégiát alkalmazhat a tojó utódai védelmében szuboptimális körülmények között? Van-e ebben a folyamatban valamilyen szerepe a szteroidoknak? Ennek modellezése és a kérdés megválaszolása stressz-hatások kísérletes alkalmazásával megoldhatónak látszik. Így – támaszkodva az irodalom adataira - az a kérdés fogalmazódott meg bennem, hogy vajon mi történhet az anyát ért stressz hatására a szikbe deponált szteroidok mennyiségével és ezek arányával, és ennek hatására mi történhet az embriógenezis folyamatával és a kikelt fiókákkal? Vizsgálatainkban mind az ún. „neurogén handling"-, mind pedig a fizikális éter stresszhatásokat értékeltük a tojó, valamint az embrió perinatális- és az utód posztnatális fejlődése szempontjából.

1.1 Célkitűzések

1. A Schwabl-féle tojásszik szteroid analízisek (1993) adaptálása és módosítása, a szteroid analízisek dehidro-epiandroszteronra és progeszteronra való kiterjesztése.
2. A tojásszik tesztoszteron, 17-β-ösztradiol és kortikoszteron koncentráció változásainak feltérképezése az inkubáció első 8 napjában.
3. A fekális szteroid analízisek kortikoszteronra való kiterjesztése, illetve a plazma és bélsár közötti fázis eltolódás meghatározása tőkés réce esetében.
4. A kézbevétel (handling) stressz hatása a tojásszikbe deponált szteroidokra, az inkubáció alatti embriógenezisére és a kikelt utódok fejlődésre.
5. Az éter-inhalációs stressz hatása a tojásszikbe deponált szteroidokra, az inkubáció alatti embriógenezisére és a kikelt fiókák ontogenezisére.

2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

2.1. A stressz hatása az utódokra

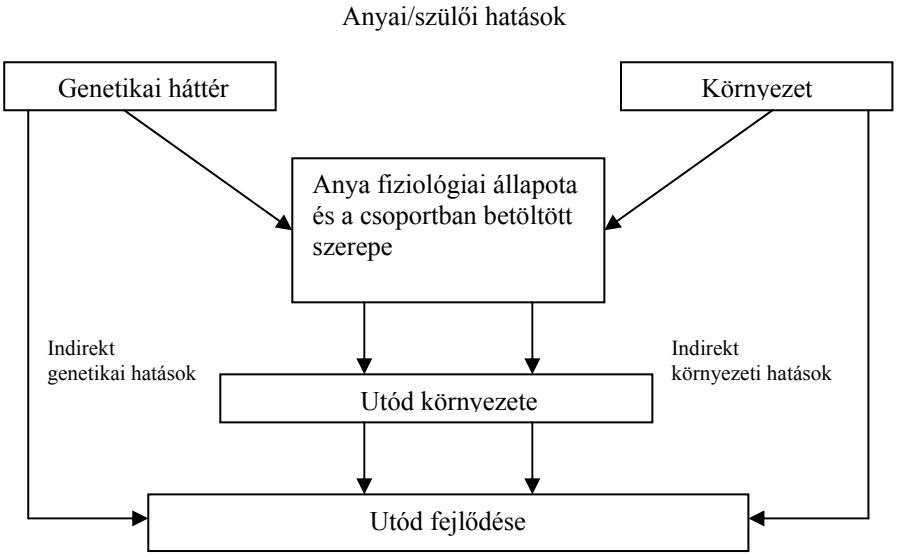
Az utódvizsgálatoknál felmerül a kérdés, hogy a tojót ért stresszhatások hogyan befolyásolják a következő nemzedéket. Az emlősöknél már régóta ismert, hogy ha egy vemhes nősténynél glükokortikoid kezelést alkalmazzunk, akkor az utód(ok) születési testtömege szignifikánsan alacsonyabb lesz, mint a kontroll csoportban (Weinstock et al., 1998). Ez a hatás jelentkezik mind krónikus, mind akut stressz alkalmazásánál is. Azt is megfigyelték, hogy a reprodukciós ráta jóval alacsonyabb a szubdomináns hímekkel történt párosodást követően, mivel a rangsorért folytatott harcban történt alulmaradás a glükokortikoid koncentráció növekedését okozza, amely szupresszálja a hím reprodukciós kapacitását (Creel, 2001). A domináns egyedek tanulmányozásakor az is kiderült, hogy a plazmában az alap glükokortikoid érték magasabb, mint a szubdomináns egyedeknél, de egy szociális rangsorért vívott harc után a szubdomináns egyedekben magasabb glükokortikoid szintet lehet kimutatni, mint a domináns egyedekben. Ez a jelenség mind madaraknál, mind emlősökben (rágcsálók, főemlősök, ragadozók) megfigyelhető (Creel, 2001).

Mind vadon élő madaraknál, mind pedig a baromfitenyésztésben fontos (sőt a technikai civilizáció kiterjedésével egyre fontosabb) a szülői generációt ért stresszhatások utódokra való áttevődésének a kérdésköre.

A madárfiókák fenotípusát nemcsak a genetikai örökítőanyag átadása befolyásolja, hanem egyéb epigenetikus maternális hatások is. Az együttes anyai hatást a tojásszikbe deponált különböző biológiailag aktív vegyületek készletének átadása jelenti, ezek a vegyületek lehetnek: mitokondrium, maternális RNS, különböző fehérjék, antitestek, antioxidánsok, hormonok, stb, amelyek nélkülözhetetlenek az embriófejlődéshez.

Az utódfejlődést indirekt genetikai hatások is módosíthatják, ilyen például a szülői táplálás a fiókanevelés alatt, hiszen a sikeres táplálékszerzés részben a szülők genetikai tulajdonságaitól függ, ha mindkét szülő „jó genetikai hátérrel rendelkezik”, akkor sikeresebbek lesznek a fiókanevelésben és a fióka fejlődése is optimális lehet. Természetesen létezik a másik oldal is, az ún. indirekt környezeti hatások is, ezek alatt azt értem, hogy a környezet determinálja a táplálék mennyiségét és minőségét és ezen keresztül befolyásolja a fészekalj fejlődését (Groothuis, 2005).

Az alábbi sematikus **vázlat** az anyai hatásokat szemlélteti (*1. ábra*)



1. ábra Anyai hatások az utód fenotípusára és fejlődésére (Groothuis, 2005 nyomán módosítva)

2.1.1. A maternális stressz hatások emlősökben

Az anyai szervezetet ért stressz effektusok embriót károsító hatásai elsősorban a központi idegrendszer, a hypothalamo-gonadotrop rendszer, valamint a szimpatiko-adrenalis rendszer befolyásolásán keresztül jelentkeznek. Igen régóta ismert az, hogy a terhes anyákat ért emocionális zavaró hatások az újszülött csecsemőkben szopási problémákat és ennek eredményeként fejlődési lemaradást okoztak. Ugyancsak számos szerző számolt be arról, hogy szoros összefüggés van az anyákat ért pszichés stresszhatások és az újszülöttek születési súlya között (Wadhwa et al., 1993; Lou et al., 1994). Az ilyen gyermekeknél gyakori volt a hiperaktivitás és későbbiekben figyelemvesztési- és tanulási zavarok jelentkeztek (Van den Bergh et al., 2005). A néhány év múlva a gyermekekben jelentkező epilepsziás, depressziós, sőt skizofrén tünetek gyakran, s ugyancsak a maternális stressz hatásokra voltak visszavezethetők (Kofman, 2002).

Állatkísérletekben megállapították azt, hogy ha a vemhes patkányokat „footshock" stressz kezelésben részesítették, akkor az újszülöttekben a plazma kortikoszteron alapszintjének szignifikáns növekedése lépett fel**,** kontroll újszülöttekhez képest. Ha ezeket az utódokat stresszhatásnak tették ki, akkor a noradrenalin és adrenalin szint növekedése nagyobb volt a stresszelt anyáktól származó utódokban, ami arra utal, hogy a prenatalis stressz hosszú ideig tartó változásokat eredményez az utódok szimpatiko-adrenális rendszerében (Weinstock et al., 1998).
Ismert továbbá az, hogy a prenatalis stressz által okozott glükokortikoid szekréció fokozódás megváltoztatja a szteroid receptorok mennyiségét a *hippocampusban,* ami hatással van a *hippocampus* kialakulására az embrionális időszakban (Takahashi, 1998). Az anyát ért stresszhatás

a szerotonin turnovert is módosítja az újszülöttekben, amely az agyban 49 %-kal nőtt pl. patkányokban, ugyanakkor az újszülöttekben a *hippocampus* területén a szinapszisok száma jelentős mértékben csökkent (Hayashi et al., 1998). Az anyaállatot ért stresszhatások a fetalis hypothalamo-kortikotrop tengely egészében jelentős változásokat okoznak. Akut körülmények között a gesztációs periódus második felében az embrió az anyát ért stresszhatásokra CRF és β-endorfin elválasztás fokozással reagál a *hypothalamus* területén, illetve a vérplazma ACTH és kortikoszteron szintjének növekedésével (Weinstock, 2001). A drasztikus stressz effektusok hatása mellett tanulmányozták a tartáskörülmények: az ún. „szociális környezet" hatását is a vemhesség idején. A stabil szociális körülmények között élő tengerimalacok hím utódaiban a hypothalamo-kortikotrop rendszer és mellékvesekéreg késleltetett fejlődését figyelték meg, amelyet a szimpatiko-adreno-medulláris rendszer alacsonyabb aktivitása kísért. Ugyanakkor a fiatal állatok tesztoszteron plazma szintje nem mutatott eltérést a kontroll állatokhoz képest. Jellegzetesnek találták a stresszelt anyáktól származó utódok esetében a magatartásmintázat „infantilizálódását", elmaradását a stabil szociális környezetben tartott anyaállatok utódaitól (Kaiser és Sachser, 2001).

A maternális stressz az utódban, nem csak az adreno-kortikotrop rendszerre hat, hanem befolyásolni képes a gonadotrop tengely szabályzását is. Patkánykísérletekben, az anyát ért stresszhatás az elsődlegesen károsított *hippocampus* mellett az agykéreg szerkezetének magváltozását is okozta, azaz jelentősen csökkentette a hímek agykérgének aszimetriáját és ez által növelte az agykéreg hasonlóságát a nőstényekhez (Weinstock, 2001). Ugyancsak megfigyelték, hogy a mellékvese központi szabályzásáért felelős struktúrák mellett a gonadotrop-hypothalamusban, mégpedig elsősorban hímekben morfológiai változások következtek be. Már 1972-ben Ward (1972) leírta, hogy a stresszelt anyák hím utódai feminizálódtak. Így csökkent a szexuálisan dimorfikus *preoptikus area* mérete és ugyanakkor az *anteroventralis periventrikuláris mag* mérete növekedett hímekben, vagyis csökkent a hímek és nőstények közti különbség. Az embriófejlődés során elszenvedett stresszhatás más módon is befolyásolta a hypothalamus ivari dimorfizmusát. A *hypothalamus* és az *amygdala* aromatáz aktivitása csökkent hímekben, míg nőstényekben változatlan maradt. A gonadotrop rendszert ért károsító hatások az embriók gonádfejlődésében is megmutatkoztak. Amennyiben az anyaállatokat immobilizációs, zaj vagy erős fénystressznek tették ki, akkor a hím újszülöttek esetében megfigyelhető volt az anogenitális távolság csökkenése, amely közelített a nőstényekre jellemző értékhez. Ugyancsak megfigyelhető volt az újszülöttek heretömegének csökkenése, valamint az ivarérés környékén a Leydig-sejtek 3β-hidroxiszteroid-dehidrogenáz aktivitásának csökkenése. Ezek az adatok egyértelműen a spermatogenezis és a tesztoszteron-produkció szimultán csökkenésére utalnak (Weinstock, 2001). A prenatális stressz hatások nőivarú patkány utódoknál is fertilitási és termékenyülési problémákat okoztak (Herrenkohl, 1979).

2.1.2. A maternális stressz hatások halakban és hüllőkben

Halaknál, a megemelkedett glükokortikoid szint - a kortizol – növelte a szivárványos pisztrángpeték (*Oncorhynchus mykiss*) mortalitását (Pottinger és Carrick, 2000), csökkentette a kikelés utáni lárvaméretet egy korall halfajnál (*Pomacentrus amboinensis*) (McCormick, 1999), valamint tőkehalon (*Gadus morhua*) végzett vizsgálatoknál növelte az abnormális lárvák gyakoriságát (Morgen et al., 1999).

Hüllőkben, egy elevenszülő gekkófajnál (*Hoplodactylus maculatus*) kortikoszteron implantátum segítségével megemelt maternális kortikoszteron szint fejlődési rendellenességeket okozott, néhány esetben pedig vetéléshez, illetve az embriók felszívódásához vezetett. Más egyedekben az embriók növekedését, fejlődését lassította (Cree et al., 2003). Egy másik elevenszülő fajnál, az elevenszülő gyíknál (*Lacerta vivipara*) a megemelkedett kortikoszteron koncentráció csökkentette a juvenilis méretet, az utódok kondícióját és lassította növekedésüket (Meylan és Colbert, 2005). Más vizsgálatban megállapították, hogy a magas glükokortikoid szint megváltoztatta az utódok viselkedését: csökkentette a születés utáni aktivitásukat, exploratív viselkedésüket, diszperziójukat, erősítette az utódok philopátriáját, azaz a születési helyhez való kötődésüket (de Fraipont et al., 2000). További érdekes jelenséget is megfigyeltek: a kortikoszteronnal kezelt nőstények hím utódainál szignifikánsan magasabb volt a túlélés, míg a nőstény utódok között ebben a tulajdonságban nem okozott semmilyen változást a maternális glükokortikoid kezelés. Tehát a hím utódoknak egyfajta adaptív előny jelentett az anyát ért stresszhatás (Meylan és Colbert, 2005). A kaliforniai foltosoldalú gyíknál (*Uta stansburiana*) a nőstényekbe a szaporodási ciklus megkezdése előtt kortikoszteron implantátumot ültettek szubkután, ez a megemelt glükokortikoid koncentráció megjelent a tojásszikben is, és az ebből kikelt utódok agresszivitását fokozta (DeNardo és Sinervo, 1994).

2.2. Tojásszikbe deponált szteroidok

A tojásszteroid vizsgálatok már az 1920-as évekre vezetnek vissza, bár ezek a korai direkt bioassay-k nem tűntek túl megbízhatónak, sőt esetek többségében sikertelennek is bizonyultak. A meghatározások főként az ösztrogénekre irányultak (Hertelendy és Common, 1965). Más vizsgálatok a tojó hormonális befolyásolására irányultak. 1942-ben *Riddle és Dunham* publikálta először, hogy az ösztrogénnel kezelt tojótyúkoktól származó tojásokból kikelő kiscsibék feminizálódtak, és ez igaz volt akkor is, amikor csak a tojásokat kezelték. A második mérföldkő az volt, amikor 1972-ben *Acros* bizonyította, hogy radioaktív ösztrogénekkel (ösztradiol és ösztron) kezelt tojótyúkok tojásaiban is mérhetőek voltak a radioaktív ösztrogének, tehát igazolta a

szteroidok beépülését a szikbe és emellett még feltételezte, hogy a szteroid mennyiség hat a tojásban fejlődő embrióra is.

Azonban**,** a valódi áttörést mintegy egy évtizede Schwabl (1993) munkája hozta, aki a tojásszikből Radio Immuno Assay-vel rutinszerűen megoldotta a különböző szteroid hormonok kimutatását. Ő igazolta először, hogy a kanári (*Serinus canaria)* és zebrapinty (*Taenopygia guttata)* tojássárgája nagy mennyiségű androgént tartalmaz (elsősorban tesztoszteront (T), dihidrotesztoszteront (DHT) és androszténdiot (A4)). Kis mennyiségben - de mindkét faj tojásaiból-tudott 17-β-ösztradiolt (E2) kimutatni, emellett sikerült még kortikoszteront is detektálni –igaz, igen kis mennyiségben- és csak a zebrapinty fajnál.

A fent említett szteroidokon túl még sikeresen kimutattak a szikből trijódtironint és tiroxint (McNabb és Wilson, 1997) és progeszteront (P4) (Lipar et al., 1999b), végül munkacsoportunknak sikerült egy másik androgént mérni, a dehidro-epinandroszteront (DHEA) (Szőke et al., 2004, 2005). A legtöbb kutatás az androgénekre fókuszál, pedig az ösztrogéneknek illetve a kortikoszteronnak is jelentős lehet az embriófejlődésben betöltött szerepe. Ez a tudományterület jelen időszakban reneszánszát éli a különböző viselkedésbiológiai, ökológiai és stresszélettani kutatásokban.

Vajon hogyan jutnak a hormonok a szikbe?

Sajnálatos módon még kevés irodalmi adat áll rendelkezésünkre. Eddig még nem tisztázott az a kérdés sem, hogy aktív- vagy passzív úton történik a szteroidok szikbe történő beépülése. A szteroidok szerepe az utód fenotípusára nem megkérdőjelezhető, ezért egy pontos szabályozó mechanizmusnak kell mögötte állnia. A túl magas androgén koncentráció káros az embriónak, tehát a tojónak valahogy meg kell akadályoznia a vérkeringésében cirkuláló szteroidok átjutását a fejlődő petébe (Gil, 2003). Ezt támasztják alá a következő eredmények is: japánfürj tojóba injektált radioaktívan jelölt tesztoszteron esetében a beadott összes mennyiségnek csupán 0,1%-a jutott át tojásba (Hackl et al., 2003), tojótyúknál radioaktívan jelölt kortikoszteron *intra vénás* injekció után, a szikben a jelölt szteroid 1%-a jelent meg (Rettenbacher et al., 2005). A fenti eredmények alapján, azonban a szisztémás keringésből történő beépülés nem túl valószínű. Egy másik hipotézis szerint, a tüszők *granolosa* és *theca* sejtjeiben szintetizált különböző szteroidok épülnek be a szik külső rétegeibe (Gil, 2003). A tüszők szteroid produkcióját illető irodalom rendkívül gazdag. Régóta ismert, hogy a preovulációs tüsző *granulosa*-ja a progeszteronnak, míg a *theca* sejtek az ösztrogéneknek és androgéneknek legfőbb forrása (Huang et al., 1979). A szteroid szintézis ún. „háromsejtes-modellje" szerint (Porter et al., 1989) a *granulosa* által termelt progeszteront a *theca interna* sejtek androgénné konvertálják, amelyet aztán a *theca externa* sejtek alakítanak át ösztradiollá, mindamellett, hogy a *theca interna* sejtek a *granulosa*-tól függetlenül is képesek

progeszteront és androgéneket előállítani (Nitta et al., 1991). A *theca internában* mért ösztradiol valószínűleg diffúzió révén jut el a *theca externából*, vagyis feltételezhetően parakrin módon (Kato et al., 1995). A granulosa és theca sejtek szteroid szintézisének szabályozása a preovulációs tüszőméretnél már elsősorban LH szabályozás alatt áll, adenilil cikláz/cAMP függő messenger közvetítésével, amely rendszer egyre érzékenyebbé válik az ovuláció közeledtével (Tilly és Johnson, 1990).

2.2.1. Szikbe deponált androgének szerepe

A leginkább kutatott terület a szikbe deponált androgének kérdésköre, s ennek talán az is a magyarázata, hogy igen nagy mennyiségben fordulnak elő a szikben, túlnyomóan a tesztoszteron (T) dominancia a jellemző. Az eddig vizsgált madárfajok közül csak egy fajnál, a pásztor gémnél (*Bubulcus ibis*) találtak egyedül androszténdion dominanciát (Schwabl, 1997).

Számos vizsgálat irányult arra, hogy a kísérletesen manipulált szik androgén koncentráció miként hat az embriófejlődésre és a kikelt fiókák különböző egyedfejlődési stádiumaiban. A mesterségesen megemelt szik T szint hatására az ún. táplálék-kéregetés gyakorisága nőtt és ezáltal a fióka testtömeg-gyarapodása intenzívebbé vált (Schwabl, 1993). A pirosvállú csirögénél (*Agelaius phoeniceus*) a megemelt tesztoszteron koncentráció egyenes arányban áll a nyaki izmok méretével (Lipar és Ketterson, 2000). A szikben található androgén erős pozitív korrelációt mutat - seregélynél is - a kikeléskori izom tömeggel (Lipar, 2001). A dankasirályon (*Larus ridibundus*) végzett kutatások azt igazolták, hogy a T injektált tojások hamarabb keltek, azaz csökkent az inkubációs periódusuk, így mérsékelve a kelés aszinkrónia jelenségét (Eising és Groothuis, 2002). Valamint a táplálékkérő viselkedésük is intenzívebbé vált (Eising és Groothuis, 2003), aminek következtében gyorsabban nőttek és nagyobb testméretűek lettek, és testvéreikkel szembeni kompetitív előnyük is hatékonyabbnak bizonyult (Eising et al., 2001).

A fenti eredmények azt sugallják, hogy a kísérletesen megemelt T szint már embrionális korban, *in ovo* fejtheti ki hatását, bár ezen elméletnek kissé ellentmond, hogy a füstifecskénél (*Hirundo rustica*) a szikbe deponált koncentráció pozitívan korrelált a fiókák növekedési erélyével, de keléskor nem volt különbég a kelési testtömegben és méretben (Gil et al., 2003). Teljesen ellentétes eredményt is publikáltak, a tarka vércsénél (*Falco sparverius*), ahol is a tojásba injektált tesztoszteron az inkubációs időt hosszabbította, csökkentette a fiókák növekedési erélyét, valamint túlélésüket (Sockman és Schwabl, 2000). Ezenfelül a T-injektált tojásokból kikelő fiókákban magasabb plazma kortikoszteron szintet mértek, mint kontroll társaikban (Sockman és Schwabl, 2001). Természetesen ez az emelkedett glükokortikoid szint csökkent növekedéssel párosult.

A fentiek alapján két eltérő mechanizmus állhat a szik androgén koncentráció és a fiókák növekedési erélye összefüggés hátterében: (1) az androgének ún. direkt fiziológiai hatása a

növekedési rátára, a fokozott anyagcsere és (2) a viselkedésbiológiai hatásai, mint pl. a táplálékkérő viselkedés és a testvérek elleni agresszió fokozódása (Gil et al., 2003).

Schwabl (1993) első vizsgálatai alapján bizonyítást nyert, hogy a kanári tojásaiban a tesztoszteron mennyiség fokozatosan nőtt a lerakott tojások számával. A feltevés szerint a növekvő androgén koncentráció kompenzálja a később lerakott tojás és utód „hátrányosabb" helyzetét (Schwabl, 1996), valamint - a már említett - kelés szinkronizálásához is hozzájárul, emellett a szik tesztoszteron tartalma és a kikelt fiókák agresszivitása és életrevalósága között határozott pozitív összefüggés volt kimutatható (Eising et al., 2001). A tojásrakás sorrendjétől függően lehet csökkenő és növekvő androgén depozíció, illetve véletlenszerű (azaz nem függ a lerakás sorrendjétől).

Az eddig vizsgált fajoknál *három stratégiát* írtak le:

1. A deponált androgén mennyiség nő a lerakott tojások sorrendjétől függően, ilyen allokációt figyeltek meg a már említett fajokon (kanári és dankasirály) kívül a pirosvállú csirögénél (Lipar és Ketterson, 2000), a tarka vércsénél (Sockman és Schwabl, 2000), küszvágó csérnél (*Sterna hirundo*) (French et al., 2001) és házi verébnél (Mazuc et al., 2002).
2. Szik androgén tartalom csökkent az egy fészekaljban lerakott tojások sorrendjével. Ezt a jelenséget figyelték meg a pásztorgémnél (Schwabl et al., 1997), gyűrűscsőrű szárcsánál (*Fulica americana*) (Reed és Vleck, 2001) és zebrapintynél (Gil et al., 1999), bár ez utóbbi fajnál olyan eredményeket is közöltek, hol nem volt összefüggés az androgén tartalom és a szekvencia között (Ward et al., 2001).
3. Az eltérő androgén depozíció nem függ össze, hogy hányadiknak számít a fészekaljban. Ez az allokáció volt jellemző az amerikai ökörszemre (*Troglodytes aedon*) (Ellis et al., 2001), a japán fürjre (Hackl et al., 2003) és a széncinegére (*Parus major*) (Tschirren et al., 2004).

A tojásokban egymástól és a tojótól is függetlenül fejlődő fiókák, tehát nemcsak génkészletükben különbözhetnek, hanem az anyjuktól „útravalóul" kapott szteroid mennyiségekben is. A tojásba deponált hormonok kapcsolatot jelentenek két generáció között és emellett a tojók eltérő „életkimeneteleket" biztosítanak utódaiknak, a tojásrakás sorrendjétől függően akár egy fészekaljon belül is. A tojó számára az egyenlőtlen androgén eloszlás hatásos (eleve elrendelt) mechanizmus arra, hogy befolyásolja a testvérek közötti versengés kimenetelét (Schwabl et al., 1997; Lipar et al., 1999a; Whittingham és Schwabl 2002).

A „**Differenciált Allokáció Hipotézis**" az eredeti megfogalmazás szerint azt mondja ki, hogy azok a tojók, amelyeknek vonzó párjuk van, jobban segítik utódaikat, mint azok, amelyeké kevésbé

attraktív (Burley, 1988). Ez az eltérő maternális befektetés megjelenhet a fészekalj ivararányának eltolásában (Ellegren et al., 1996), a fészekaljméretben (Petrie és Williams, 1993) és a tojásméretben (Cunningham és Russel, 2000). Ez a hipotézis az androgén depozíciónál is megfigyelhető, létezik preferenciális és kompenzatórikus allokáció is (Pilz, 2003).

- *Prefenciális differenciált allokáció:*

Gil és munkatársai (1999, 2003) kimutatták, hogy a zebrapinty és a füsti fecske (*Hirundo rustica*) tojók, ha attraktív párjuk van, emelik tojásaik átlagos androgén szintjét. Ugyanezt a jelenséget figyelték meg tőkés récéknél (*Anas platyrhynchos*), sőt itt a magasabb androgén allokáció magasabb tojástömeggel is párosult (Cunningham és Russel, 2000). Természetesen a nagyobb tojásba több nutritív és más biológiailag aktív anyag is kerülhet, amelyek elősegíthetik az utód nagyobb rátermettségét, jobb túlélési esélyét. A kanári tojók, ha számukra vonzó éneket hallanak, szintén növelték az androgén koncentrációt (Gil, 2004). Michl és munkatársai (2004) örvös légykapónál (*Ficedula albicollis*) megfigyelték, hogy nem a hím attraktivitása, hanem az életkora a döntő szerepű az androgén allokáció szempontjából. Házi verebeknél a csoportban betöltött szociális rangsor is befolyásolta a magasabb androgén allokációt, ennek következtében a domináns tojó utódainak jobb volt a túlélésük és a rátermettségük is jobbnak bizonyult (Strasser és Schwabl, 2000).

A fészekaljak között tehát nemcsak a génkészletekben lehet különbség, hanem az embriófejlődést támogató hormonális miliőben is. Tehát az ún. „jobb minőségű" utódok fenotípusát az attraktív, vagy idősebb, tapasztaltabb, nagyobb túlélésű apától öröklött gének és a fokozott anyai befektetés együttesen alakíthatják.

- *Kompenzatórikus differenciált allokáció:*

A „Differenciált allokáció" hipotézise kiterjeszthető a kompenzációs irányba is. Eszerint a tojó akkor növeli befektetését, ha kevésbé vonzó, gyengébb genetikai háttérrel rendelkező a párja van. Ezt a kompenzációs stratégiát találták a füsti fecskénél (*Hirundo rustica*), ahol a tojók több luteint deponáltak tojásaikba, amikor kevésbé vonzó párt találtak maguknak (Saino et al., 2003).

Az eltérő szik androgén depozíció közvetetten arra utal, hogy ez a mechanizmus költséges. Ha ez így van, akkor a befektetés mértéke és a tojó minősége között összefüggést tételezhetünk fel. A tojó minőségétől függő androgén allokációt eddig három vizsgálat támasztotta alá, seregély esetében az idősebb tojó, füsti fecske esetében a korábban érkező tojók fészekaljaiban volt magasabb a tesztoszteron koncentráció (Pilz et al., 2003; Gil et al., 2003) A háromujjú csüllőknél (*Rissa tridactyla*) a tojásszikbe több immunglobulint deponáló tojók fészekaljaiban a tojás androgénszintek is magasabbak voltak (Gil, 2003).

A másik hipotézis a „**Fiziológiai Epifenomenon**” tézise, mely azt mondja ki, hogy a szikben megjelenő androgének ovariális melléktermékek, melyek szintézise a tojó fiziológiai státuszától függ (Pilz, 2003).

De vajon mi az „ára” a szikbe deponált androgéneknek? Meddig célszerű növelni a szteroid mennyiségeket?

(1) Immundepresszió

Számos szerző beszámolt már az androgének és glükokortikoidok immunrendszerre gyakorolt káros hatásairól is (Folstad és Karter, 1992; Da Silva, 1999), mivel megemelkedett koncentrációban immundepressziót okozhatnak, amely az enzimatikus antioxidáns rendszer gyengülésén vagy az oxidatív stressz indukálásán keresztül hat (Chainy et al., 1997). Egy kísérleti példa is igazolja ezt a hipotézist, mely szerint a megemelkedett szik T koncentráció magasabb plazma kortikoszteron értékeket indukált a fiókákban. (Sockman és Schwabl, 2000). Feltételezhető, tehát valamilyen mechanizmus a tojók szabályozniuk kell a szteroid allokációt, hiszen az *in ovo* fejlődő embrióknak tolerálniuk kell a magasabb immundepresszióval járó androgén befektetést.

(2) Metabolikus „költség”

A megemelt szik androgén szint növeli a fiókák energiafelhasználását (metabolikus költségét) (Eising et al., 2003).

(3) A tojó reprodukciós kapacitásának csökkenése

A megemelt androgén depozíció megemelheti a tojó vérplazma androgén szintjét, és ez zavart okozhat a fészeképítési viselkedésben, de a tojásrakás és kotlási magatartási formák is károsodhatnak (Nelson, 2000).

(4) Predáció veszélye

Azok a fiókák, akiknek intenzívebb a táplálékkérő magatartása és hangosabbak nagyobb valószínűséggel válnak egy ragadozó áldozataivá (Haskell, 1994). Amennyiben elfogadjuk, hogy a megemelt androgén allokáció és a gyakoribb táplálékkérő viselkedés között pozitív összefüggés van, akkor ez a befektetés igen nagy rizikóval jár a populáció egészét is tekintve (Gil et al., 2003).

(5) Maladaptív (evolúciósan hátrányos) testvér agresszió

A magas szik androgén koncentráció maladaptív (károsodott adaptációs képesség) fészekalj redukcióhoz vezethet, melyet bizonyos mértékben kompenzálhat a gyorsabb testtömeg-gyarapodás. Emellett az erőteljesebb növekedési erély és a gyakoribb táplálékkérés a szülők fokozottabb igénybevételét követeli meg (Royle et al., 1999).

(6) Ivararány optimalizálás

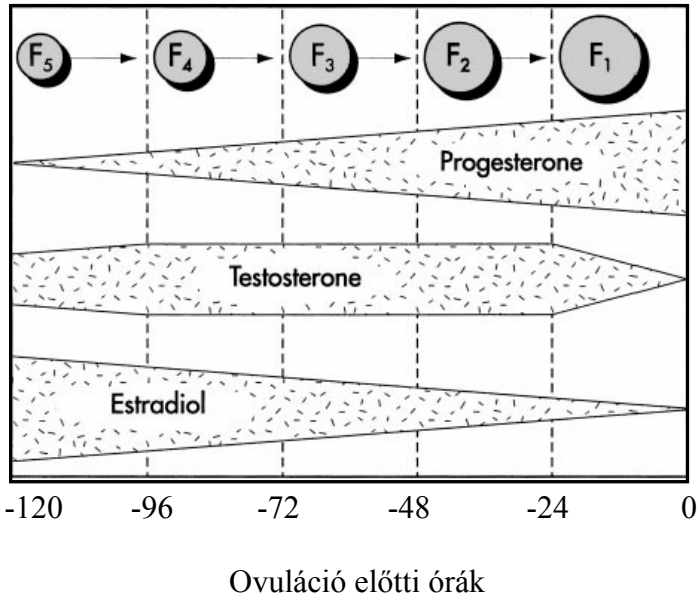
Az androgén koncentráció-változásnak lehetnek az ivareloszlásra vonatkozó hatásai. Ha felborul a kényes egyensúly, akkor ivararány eltolódás is felléphet (Gil et al., 2003).

2.2.2. 17-β-ösztradiol (E2) allokáció hatásai az utódokra

A szikbe deponált 17-β-ösztradiol hatásairól igen kevés irodalmi adat áll rendelkezésünkre. A különböző irodalmi adatok mind megegyeznek abban, hogy jóval kisebb mennyiségben találhatóak az ösztrogének a tojásszikben, mint a különböző androgének (French et al., 2001; Elf és Fivizzani, 2002). A küszvágó csérnél (*Sterna hirundo*) megfigyelték, hogy az androgénekhez hasonlóan a tojásrakás sorrendjével az E2 depozíció is összefüggött, e fajnál a 3 tojásos fészekalj a jellemző és fokozatosan nőtt a koncentráció, a legkisebb értékeket az első tojásokban a legmagasabb értékeket a harmadik tojásokban mérték (French et al., 2001). Az ösztrogénnel kezelt tojótyúkoktól származó tojásokból kikelő hímivarú kiscsibék feminizálódtak, és ez igaz volt akkor is, amikor csak a tojásokat kezelték (Riddle és Dunham, 1942; Faucounau et al., 1995). A tojásba injektált E2 hatására a japán fürj hímembriókban a balodali here ovotestis-szé (szövetében spermatogenetikus és ovogenetikus egységek egymás mellett találhatók) alakult át, a jobb oldali pedig atrofizálódott (Razia et al., 2006). Emellett a megemelt E2 koncentráció a *bursa Fabricii* szupresszióját is okozta, azaz a szerv tömege csökkent az ösztrogén kezelés hatására (Zarrow et al., 1961). A kikelt napos állatok testtömegében nem volt különbség a kontrol csoporthoz képest (Razia et al., 2006). Zebrapintynél írták le, hogy a közvetlenül tojásrakás előtti periódusban E2-*vel* injektált tojók szignifikánsan több nőivarú utódot produkáltak kontroll társaikhoz képest (Williams et al., 1993; 1999). A szubkután implantált ösztrogénnel kezelt tojók utódainál alacsonyabb volt a kirepülési siker (Williams, 1999). Ezt a kísérletet megismételték (von Engelhardt et al., 2004), de ők csak részben kaptak hasonló eredményt, vizsgálataik szerint, csak a kikelt utódok ivararánya változott meg, mert embrionális korban magasabb volt a hímivarú embriók mortalitása. Az E2 kezelés hatására mintegy 12 órával csökkent az inkubációs idő, azaz fél nappal korábban keltek a kezelt tojásokból származó zebrapinty fiókák, emellett a testtömeg-gyarapodásuk is intenzívebb volt kontroll társaikhoz képest, 7 napos korukban pedig, szignifikánsan nagyobbak voltak (von Engelhardt et al., 2004).

2.2.3. Progeszteron (P4) allokáció hatásai az utódokra

A tojásszikben detektált progeszteron koncentrációk és az *in ovo* fejlődő embriókra gyakorolt hatásairól nem találtam irodalmi adatot. Számos közlemény foglalkozik azonban azzal, hogy miként változik a tüsző maturációval a progeszteron produkció. A frissen megtojt tojás szikanyagában -a 2. számú *sematikus* ábra is sejteti-, hogy a szik legkülső rétege tartalmazza a legnagyobb koncentrációban a P4-t, az E2 koncentráció a legbelső rétegben a legmagasabb, míg a legmagasabb T tartalmat a szik középső részén mérték (Forgó et al., 1988*a,b*; Lipar et al., 1999*b*).



2. ábra Sematikus ábra a follikuláris szteroid koncentráció-változásokról a tüsző érése folyamán (Bahr et al., 1983 és Lipar et al., 1999b nyomán)

2.2.4. Dehidro-epiandroszteron (DHEA) hatásai az utódokra

Bár az irodalmi áttekintés struktúráját tekintve erről a szteroidról a tesztoszteront követően kellene említést tennem, de - hasonlóan a progeszteronhoz - itt sem találtam irodalmi adatot a szikbe deponált DHEA koncentráció utódra gyakorolt hatásáról.

A DHEA mind emberben, mind egyéb gerinces állatfajokban sokáig „rejtélyes" adrenális szteroidnak számított, noha Butenand, danzig-i kémikus már az 1930-as években izolálta emberi vizeletből, sőt szerkezetét is igazolta (Goodson et al., 2005). A DHEA és a dehidro-epiandroszteron-szulfát (DHEA-S) elsődleges keletkezési helye a mellékvesekéreg (főként a *zona reticularis*), de a petefészek theca sejtjei is szintetizálják (Orth et al., 1992). Azonban az elmúlt 15 évben fedezték még fel, hogy emberben, emlősökben, madarakban és kétéltűekben a központi és perifériás idegrendszerben is jelentős DHEA koncentráció található, sőt ezek a szteroidok jórészt koleszterolból, vagy más szteroid prekurzorból itt szintetizálódnak a glia elemekben és az idegsejtekben (Tsutsui et al., 1999). A madarakban a DHEA szintézisének elsődleges helye a

diencephalon és a *mesencephalon*, s így ennek a neuroszteroidnak a szerepe feltehető a neuroendokrin funkciók modulációjában is (Ukena et al., 2000).

A DHEA elválasztása a humán és az emlős adatok szerint cirkadiális jellegű és a kortizol profilra jellemző (Garde et al., 2000). Patkányokban, mint anti-stressz hormon hat, gátolja a stressz okozta testtömegcsökkenést, mellékvese tömegnövekedést, a glükokortikoid receptorszám növekedést a májban, lépben és a *thymusban* (Hu et al., 2000). Ezek az élettani jelenségek is igazolják a glükokortikoidokkal szembeni antagonizmusát (McIntosh et al., 2000). Ezt az inverz hatást támasztja alá az a megfigyelés is, hogy a 21-hidroxiláz gátlása a DHEA produkció növelését és a kortizol szintézis csökkenését okozta (Mesiano et al., 1999).

Madaraknál egyetlen olyan vizsgálatot találtam, ahol a fióka rátermettségét, agresszivitását, stressztűrőképességét vetették össze a plazma DHEA szintjével, illetve T és kortikoszteron (B) koncentrációval. Az álarcos szula (*Sula granti*) általában 2 tojást rak és az első fióka mindig elpusztítja a másodikat, kilöki a fészekből. A DHEA koncentráció mindig az első fiókában, még a másik kibújása előtt a legmagasabb, míg a T és B a második fióka megjelenésekor mutatja a legnagyobb koncentrációt (Ferree et al., 2004), tehát a magas DHEA szint mintegy „vésztartalék-ként" funkcionál, szükség esetén –kikel a testvér- gyorsan átalakulhasson tesztoszteronná. A tesztoszteronnál már említettem, hogy igen költséges a tojásba allokált magas T tartalom, talán alternatív módja lehet a DHEA deponálás is, mert ez a szteroid könnyen konvertálódhat tesztoszteronná: DHEA (3β- hidroxyszteroid-dehidrogenáz (HSD) enzim) →A4 (17β-HSD enzim) →T (Hau et al., 2004, Soma et al., 2004).

2.2.5. Kortikoszteron (B) allokáció hatásai az utódokra

Kevés irodalmi adat áll rendelkezésünkre arról, hogyan és miként transzportálódik a *madarakban* az elsődleges glükokortikoid**,** a kortikoszteron a tojásszikbe és ez az ott jelenlevő számottevő mennyiség, hogyan hat az embrió fejlődésére. Bár az összes eddig detektált szteroidok közül a kortikoszteron koncentrációk bizonyultak a legkisebb mennyiséget adó szteroidnak (Schwabl, 1993, Hayward és Wingfield, 2004). Tojótyúkoknál a triciált-kortikoszteron injekció beadása után egy nappal a legnagyobb radioaktivitás az albumen frakcióban és a tojásszik legkülső rétegében volt detektálható, míg a legmagasabb értéket a kezelések 4.-7. napján mérték és akkor már a szik belsejében volt a legmagasabb az aktivitás (Rettenbacher et al., 2005). Hayward és Wingfield (2004) vizsgáltai azt mutatták, ha japán fürj tojókba kortikoszteron *szilasztik* implantátumot szubkután ültettek, akkor ennek következtében szignifikánsan magasabb kortikoszteron koncentrációt mértek a tojásszikben. Tehát igazolták, hogy a vérplazmában detektált magasabb glükokortikoid koncentráció összefüggésben áll a szikben található magasabb értékkel. A

megemelkedett szik-kortikoszteron tartalom csökkentette a kezelt csoport tojásainak kelési százalékát, sőt az ezekből kikelő fürjcsibék lassabban nőttek, fejlődtek, mint kontroll társaik. Emellett a kezelés növelte a hypothalamo-hipofízis-mellékvese tengely szenzitivitását a kikelt fiókákban. A sárgalábú sirálynál (*Larus michahellis)* a megemelkedett szik-kortikoszteron nem okozott fokozott inkubáció alatti embriómortalitást, azonban a kelési időt meghosszabbította. A keltetés alatt a kortikoszteronnal kezelt tojások tömegvesztése szignifikánsan magasabb értéket mutatott a kontroll csoport tojásaihoz viszonyítva. E két jelenség együttesen arra utalhat, hogy a megemelkedett glükokortikoid koncentráció lassítja az embriogenezist (Rubolini et al., 2005). Az injektált kortikoszteron tyúkfajban is retardálta az embriófejlődést és csökkentette a napos csibék testtömegét (Eriksen et al., 2003). Az előbb említett sirály fajnál a kortikoszteron injekció csökkentette perinatális (a belső pattogzás) korban az embrió hangadásának gyakoriságát és intenzitását. Emellett a fiókák táplálékkérő magatartására is negatív hatással volt, csökkentette a gyakoriságát és hangerejét (Rubolini et al., 2005). A kevésbé intenzív táplálékkérés a fióka fejlődésében való elmaradását okozhatja, amely alacsonyabb testtömeggel és csökkent *tarsus* hosszal jár. Jelen vizsgálatban azonban nem volt statisztikailag igazolható különbség sem a testtömegben, sem pedig a *tarsus* méretében (Rubolini et al., 2005). Ezzel ellentétes eredményeket kaptak Kitayski és munkatársai (2001) háromujjú csüllőnél, ahol a szülőknek kortikoszteron implantátumot ültettek be és a tojásaikból kikelő fiókák táplálékkérő magatartása intenzívebbnek bizonyult kontroll társaikhoz képest. Füsti fecskénél a tojásba injektált kortikoszteron hatására csökkent a kelési siker (Saino et al., 2003), csökkent az utódok tömeggyarapodása, valamint a teljes kitollasodásukat is késleltette, azonban a fészekalj mortalitása nem változott meg (Saino et al., 2005).

A kortikoszteron injektált tojásokban fejlődő tyúkembriók mortalitása az inkubáció első hetében volt a legmagasabb, 15-20 %-kal kaptak magasabb értéket, mint a csak szezámolajjal kezelt kontroll tojásokban (Janczak et al., 2006). Hasonló eredményt kaptunk saját házityúkon végzett vizsgálatunkban, ahol a tojásszikben a stressz hatásra megemelkedett kortikoszteron koncentráció, 15-23%-os embrió mortalitást okozott az inkubáció első öt napjában (Szőke et al., 2005). Lay és Wilson (2002) azt találták, hogy a kortikoszteron injektált tojásokból kikelő kiscsibék agresszivitása csökkent, míg Janczak és munkatársai (2006) szerint a kezelés hatására a kiscsibék ember iránti félelme fokozódott.

Hayward és munkatársai (2005) divergens szelekcióval előállított 2 japán fürj vonalat hasonlított össze. Kiválasztottak egy alacsony fiziológiás kortikoszteron plazma szinttel rendelkező japán fürj vonalat és egy magas fiziológiás értekkel rendelkező csoportot, majd a csoportokat áthelyezték egy másik épületbe és 2 órás takarmány-, illetve vízmegvonást alkalmaztak. 3 nap múlva visszahelyezték őket a megszokott, eredeti helyükre. A kísérlet közben ellenőrizték a tojók

vérplazma kortikoszteron értékeit, majd a kísérlet hetedik napján összegyűjtötték a tojásokat is. A magas fiziológiás értékeket mutató csoport tojásaiban 96%-kal magasabb kortikoszteron szinteket detektáltak, mint az alacsony fiziológiás értéket mutató csoportnál, tehát ugyanazon stresszor hatására a glükokortikoid szint jóval magasabb emelkedést mutatott a bazális értékekhez képest.

2.3. Tojásméret változásai

Számos munka igazolta, hogy egy adott fajon, sőt egyeden belül a tojásméret változó és a tojások nagyságával arányosan nő azok szárazanyag- és energia tartalma (Etches, 1996; Cichon, 1997).

A tojásméret befolyásolási lehetőségéről az állattenyésztési szakirodalomban számos technológiai leírás foglalkozik, hiszen árutermelő állományoknál, hol a nagyméretű-, hol a kisméretű tojást keresi a piac, a fogyasztási szokásoktól függően.

A tojásméret öröklődhetősége magas h^2 értékű, tehát a genetikai háttértől függ elsősorban, de különböző tartástechnológiai módszerekkel befolyásolható bizonyos mértékben. Fontos a felnevelés alatti optimális testtömeg-gyarapodás, a helyes takarmányozás, hőmérséklet és a fényprogram (Technical Bulletin-Hendrix Poultry Breeders, 2004).

A túl nagy méretű tojások képződésének az alábbi okai lehetnek: túlzott takarmánybevitel (magas energia-, protein, aminosav bevitel), alacsony hőmérséklet, ami fokozottabb takarmány felvétellel jár. Fényprogramok közül a megszakított világítási protokollal lehet tojásméretet növelni. Ugyancsak a tojás méretének növekedését okozza a felnevelés alatti rossz tartási körülmény, illetve a helytelen, az életkornak nem megfelelő takarmányadagolás (Etches, 1996). Ezek a tartástechnológiai anomáliák részben stresszorként is hathatnak.

A túl kisméretű tojások képződésének a következő okai lehetnek: hiányos (energia-, fehérje, esszenciális zsírsav- tartalmat is tekintve) és mennyiségileg sem elegendő takarmányellátás, alacsony testtömeg a tojástermelés megindulásakor. A hosszú ideig tartó vízmegvonás, vagy nem megfelelő itató-berendezések, valamint a túl magas teremhőmérséklet, illetve az elégtelen szellőztetés is a tojásméret csökkenését idézhetik elő (Technical Bulletin-Hendrix Poultry Breeders, 2004).

A megfelelő méretű tojás a vadmadár fajoknál is a szaporodási siker egyik alappillére. Elsődleges jelentőségű a tojó tömege és kondíciója (Smith et al., 1993, Hargitai et al., 2005), amely feltételezi a megfelelő mennyiségű és minőségi táplálékot (Galbraith, 1988). A tojásméret korrelálhat a tojó életkorával, illetve tapasztaltságával (Hõrak et al,. 1995; Garamszegi et al., 2004). A tojásméretet módosíthatja a környezet hőmérséklete is (Järvinen, 1991). Az egy fészekaljon belüli eltérő méretű tojások magyarázatai az alábbiak lehetnek: a napról-napra változó táplálék mennyisége (Perrins,

1970), a tojásrakási periódus alatt ingadozó hőmérséklet (Magrath, 1992), vagy akár a tojó endogén tápanyag raktárának időelőtti kimerülése (Pierotti és Bellrose, 1986).

Az androgének szerepénél már említett „Differenciált Allokáció Hipotézis" hatással lehet a tojásméretre tőkés récénél, ha a tojó számára attraktív hímmel párosodik, akkor nagyobb méretű tojást rak, ha kevésbé vonzó hím lesz a párja, akkor pedig kisebbeket. Ezzel az úgynevezett költségesebb befektetéssel biztosítja a jobb túlélési lehetőséget a „jó génekkel" rendelkező hím utódainak (Cunningham és Russel, 2000).

Míg az előbbi adatok a fészekaljak közti különbséget taglalták, szót kell ejtenünk az egy fészekaljon belüli eltérő tojásméretekről is. Az egyik a preferenciális hipotézis, az ún. „fészekalj redukció" elmélete szerint a kelési aszinkrónia jelenség következtében az utolsó tojásokba kevesebbet invesztál a tojó, s ezek lesznek az ún. „fészek alja" tojások. Az ezekből kikelő fiókákat voltaképpen feláldozza a tojómadár (Williams et al., 1993). A másik a kompenzatórikus hipotézis „a teljes fészekalj túlélésére irányuló befektetés". Ebben az esetben a kelési aszinkrónia csökkentése a cél, ilyenkor a tojó az utolsó tojásokra fekteti a hangsúlyt, hogy az utoljára kikelt fiókának relatíve több tartaléka legyen, és ezzel az adaptív előnyével felzárkózhasson a testvéreihez (Gil et al., 2003).

2.3.1. A stresszhatások és a tojásméret interrelációja

A fent említett tartástechnológiai hibák –mint stresszorok- tojótyúkoknál eredményezhettek mind a tojásméret-növekedést (pl. a megszakított fényprogramok, vagy pedig a felnevelés alatti rossz tartási körülmények), másrészt tojásméret csökkenést (pl. hőstressz) (Technical Bulletin-Hendrix Poultry Breeders, 2004).

A kaliforniai foltosoldalú gyíkban a krónikusan megemelkedett kortikoszteron koncentráció a tojás tömegének szignifikáns emelkedését hozta és függetlenül alakult a lerakott tojások számától (Sinervo és DeNardo, 1996). Madaraknál, tőkés récénél figyelték meg, hogy a tojó hátára szerelt rádiótelemetriás adókészülék csökkentette a fészekalj nagyságát és emelte a tojástömeg átlagát (Pietz et al., 1993). Hasonló eredményeket találtunk gyöngytyúknál (Biczó et al., 2004), ahol a tojót ért handling stressz hatására a kezelést követő 6. naptól emelkedett a tojástömeg. Az azonos méretű ketrecben tartott tojótyúkoknál a létszám növelésével egyenes arányban áll a tojások méretének növekedése (Appleby és Hughes, 1991; Bell, 1995). Saját vizsgálataink szerint, a mélyalmon tartott tojótyúkoknál a mesterséges termékenyítés növelte a tojások méretét. A tojás tömege és a szikbe deponált kortikoszteron koncentráció között pozitív korreláció volt kimutatható (Szőke et al., 2005). Ezzel szemben kanáriban ezt a mechanizmust nem tudták igazolni, a kortikoszteron-implantált tojók tojásainak tömegében nem volt statisztikailag igazolható változás (Salvante és Williams, 2003), bár

a mesterségesen emelt kortikoszteron szint nem azonosítható a stressz hatására megnövekedett glükokortikoid tartalommal.

2.4. A szikbe deponált szteroidok ivararányt befolyásoló hatásai

Az ivarnak megfelelő szteroid allokáció kérdését Petrie és munkatársai (2001) vetették fel, amikor pávatojások szteroid tartalmát vizsgálták ivar szerint. A 10 napig inkubált hím embrió esetében a tesztoszteron és az androszténdion, míg hasonló korú nőivarú embrióknál a 17-β-ösztradiol és az 5-α-dihydrotesztoszteron koncentrációja volt magasabb a szikben. Ahhoz, hogy reális képet nyerjünk a maternális eredetű szteroidok koncentrációjáról fontos tisztázni, hogy az embrió szteroidtermelését az inkubáció hányadik napjától kell figyelembe venni. Gilbert 1971-ben közölt vizsgálatai szerint a csirke embrió ivarmirigyeknek szteroid termelése jóval a szöveti differenciálódás előtt kialakul. A gonád-kezdeményekben az inkubáció második napján, már a petefészek és a here szöveti szerkezetének elkülönülése előtt Δ^5-3β-hidroxyszteroid-dehidrogenáz (HSD) aktivitás mutatható ki. A hatodik napon ösztrogéneket, a nyolc-tíz napos csirkeembrió ivarmirigyeiben pedig androgéneket, ösztrogéneket és progeszteront mutattak ki (Péczely, 1987). Tehát Petrie et al. (2001) vizsgálata metodikailag problémás, mivel 10 napig inkubált tojásokat vizsgáltak és a páva teljes inkubációs periódusa mindösszesen csak 28 nap. Feltételezhető, hogy a kimutatott szteroid mennyiségek nem csak maternális eredetűek voltak.

Fejlődő madár embriókban kevésbé ismert az ivardeterminació és ivari differenciálódás kapcsolata a deponált szexuálszteroid és az embrió szteroid produkciójával, mint emlősökben. Madarak esetében az oocyta első meiotikus osztódása, a szik beépülése után, az ovuláció előtt pár órával megy végbe, és e folyamat során az egyik szex-kromoszóma a poláris testbe vándorol meghatározva ezzel a tojásban fejlődő embrió ivarát. Tehát valószínű, hogy nem a tojó deponál a kialakuló embrió ivarának megfelelő mennyiségű szteroidot a tojásba, hanem feltehetően az anyai szteroidok befolyásolják a szex-kromoszóma szegregációját az első meiotikus osztódás folyamán (Petrie et al., 2001)

Emellett még számos vizsgálat található az irodalomban, ami az ivarnak megfelelő depozícióval foglalkozik. Az ivardeterminació befolyásolása igen izgalmas terület és megfejteni a kódját szinte lehetetlen. Több ellentétes eredményt hozó publikáció jelent meg a tojásba allokált különböző szteroidok ivardeterminációt befolyásoló hatásairól, illetve azok cáfolatáról. Tehát ezen a területen is fontos az adekvát módszer alkalmazása és az eredmények kritikai felülvizsgálata.

Kétféle ivararány megoszlásról beszélhetünk: (1) az elsődleges (primer) ivararányról. Ekkor az összes fertilis tojás ivareloszlását vesszük figyelembe, tehát a keltetés alatt elhalt embriók ivarát is

meghatározzuk molekuláris genetikai módszerekkel, s azt is belevesszük a statisztikai értékelésbe. A másodlagos (szekunder) ivarmegoszláson a kikelt fiókák ivararányát értjük (Gil et al., 2003).

Házityúknál írták le, hogy a tojó szociális rangsora hatással van a szikbe deponált tesztoszteronra, vagyis minél magasabb pozíciót tölt be a tojó, annál több androgént tartalmaz a szik. A hímivarú embriót tartalmazó tojásokban több T található, mint a nőivarút tartalmazókban. E vizsgálat szerint a domináns tojók több T-t invesztálnak a hímivarú embriót tartalmazó tojásokba. A domináns tojó utódainál 64% volt hím, míg a szubordinált tojóknál 43-48 % között alakult ez az érték. Jelen vizsgálatban csak a primer ivarmegoszlást vizsgálták, néhány napos inkubáció után (Müller et al., 2002).

Ezzel szemben (Eising et al., 2003a) nem találtak összefüggést a szikbe deponált T és A4 koncentrációk és az embrió ivara között. A heringsirálynál (*Larus fuscus*) is azonosan alakult a hím- és a nőivarú embriót tartalmazó tojások T és A4 tartalma (Verboven et al., 2003), és füsti fecskénél (Gil et al., 2005) is megegyezett a T szint a mindkét ivar tekintetében. Zebrapintynél a költési előtti periódus táplálék ellátottságának és a tojásrakási sorrendnek van módosító szerepe, tehát az első tojásokban magasabb az androgén koncentráció függetlenül attól, hogy hím- vagy nőivarú embrió fejlődik és a hiányos táplálékellátás is megnövelt T allokációval jár (Rutstein et al., 2005). Egy észak amerikai fajnál, az odúfecskénél (*Tachycineta bicolor*) írták le, hogy a jobb kondícióban levő tojóknak nagyobb arányban lettek hím utódai (57±2%; szekunder értékek), feltehetően a magasabb koncentrációjú androgén allokáció állhat ennek is a hátterében (Whittingham és Dunn, 2000).

Ugyanezt a jelenséget figyelték meg pávánál (Pike és Petrie, 2005), tehát a jobb kondícióban lévő a tojó több (53-78%) hímivarú embriót tartalmazó tojása volt. Ez az egyenes arányosság a primer ivareloszlásban alakult így, és ez a kikelt pávacsibék ivarmegoszlását is meghatározta, a hímivar irányába tolódott el, bár mérséklődött a két ivar közti különbség. Emellett vizsgálták a tojó vérplazmájából mérhető tesztoszteron és kortikoszteron koncentrációk és az ivarmegoszlás kapcsolatát is. A tojók plazma emelkedett T szintjével párhuzamosan emelkedett a hímivarú embriók aránya, a kortikoszteron esetében viszont ez fordítva alakult. Érthető, hiszen a romlott kondíció hátterében valamilyen szupresszió (pl. a szociális rangsorban betöltött szerep) is állhat, s így magasabb az alap, fiziológiás kortikoszteron koncentráció jellemzi ezeket a tojókat.

Az ösztradiol allokáció hatásai az utódokra c. részben már említettem, hogy zebrapintyeknél közvetlenül a tojásrakási periódust megelőzően az ösztrogénnel injektált tojók szignifikánsan több nőivarú fiókát produkáltak (Williams, 1999, von Engelhardt et al., 2004), azonban ez csak a szekunder ivarmegoszlást tekintve igaz, mert a hímivarú embriók mortalitása jóval nagyobb volt az inkubáció alatt (von Engelhardt et al., 2004).

A differenciált hormon allokációnak vajon mi lehet az oka, milyen szerepet tölthet be az evolúcióban?

Egyrészt az életképesebb, jobb túlélésű utódok létrehozása, a szaporodási siker növelése miatt éri meg a magasabb befektetés. Másrészt az esetleges ivarararányt befolyásoló törekvések miatt, hiszen a hímek szaporodási potenciálja nagyobb, mint a tojóké, különösen igaz ez a poligám fajokra (Pike és Petrie, 2005). Azonban lényeges különbség figyelhető meg a két ivar között: míg a tojók csak a tojásbefektetéssel és/vagy a szülői utódgondozás fokozásával növelhetik költési sikereiket, addig a hímek a poligín státusszal és/vagy a párkapcsolatokon kívüli párzásokkal egyaránt emelhetik szaporodási sikereiket (Michl et al., 2002).

3. ANYAG ÉS MÓDSZER

3.1. Kísérleti állatok és tartásuk

Állatkísérleteinket Gödöllőn a Szent István Egyetem Szaporodásbiológiai Laboratóriumában végeztük, 2000-2003 között.

A vizsgálatok tőkés récéken (*Anas plathyrynchos*) történtek, melyeket természetes megvilágítású, szabadkifutós ólakban helyeztünk el. Csoportonként 15 tojóhoz 10 gácsért soroltunk, melyeket random választottunk két csoporttá. A szakirodalomban ajánlott 3:1-es ivararányt a termékenyülési problémák elkerülése érdekében 3:2-esre módosítottuk. A takarmány az állatok mindenkori fiziológiai állapotának és fajának megfelelő (starter-, nevelő-, tojó-) granulált táp volt, mészkőgrittel kiegészítve. Mind a takarmány mind az átfolyó rendszerű ivóvíz *ad libitum* állt rendelkezésre.

3.2. Kísérleti protokollok

A kísérlet kezdete előtt 1 héttel a kifutó padozatát polietilén fóliával fedtük le a könnyebb faeces mintavétel érdekében. Ezáltal egyszerűbben megoldható a padozat takarítása és elkerülhető a gácséroktól származó minták esetleges belekeveredése. A stresszkezeléseket megelőző napon délelőtt 10 órakor mindkét csoportból fekális szteroid alapadatgyűjtés történt.

3.2.1. 2002-es, első évi maternális stresszkezelések (nagyszülő-állomány)

3.2.1.1. *Handling stressz kivitelezése*:

A kontroll csoportot (1. csoport) a tartástechnológiának megfelelően, zavartalan körülmények között tartottuk.

A kísérleti csoportban (2. csoport) a tojókat a befogásuk után szállítóládába tettük és mozgattuk őket - ezzel mintegy a szállítást imitálva - 20 percig majd 10 perc szünetet követően a szállítóládába helyezést és mozgatást háromszor megismételtük. Végül vért vettünk állatainktól és bélsármintákat gyűjtöttünk. A kezelést 3 egymást követő napon megismételtük. Ezt követően 11 napig gyűjtöttük a tojásokat keltetésre, és a napi 1-3 db random kiemelt tojást szikszteroid- és embrióvizsgálatokra. Minden nap -azonos időpontban délelőtt 10-kor- bélsármintákat gyűjtöttünk a maternális szteroid analízisekhez. A kontroll csoportban bélsárgyűjtés időpontja és a tojásgyűjtés tökéletesen megegyezett a kezelt csoportéval.

1. táblázat Handling-stressz kísérleti protokoll

Handling stressz													
03.19	***20.***	***21.***	*22.*	*23.*	*24.*	*25.*	*26.*	*27.*	*28.*	*29.*	*30.*	*31.*	*04.01.*
handling stressz faeces gyűjtés: 10h; 14h; 18 h			F: 10h	F: 10h	F: 10h	F: 10h	F: 10h	F: 10h	F: 10h	F: 10h	F: 10h	F: 10h	F: 10h
Tojásgyűjtés keltetésre 03. 21-től napi 1-3 db tojás 84 órás inkubálás szik analízis és embrió szexálás													

A bélsár-, plazma- és tojás szikmintákat analizáltuk, a tojásban fejlődő embriókat molekuláris genetikai módszerrel szexáltuk (ezen módszerek részletes kifejtése lásd később a **3.6**, a **3.7**. és a **3.8** pontokban)

A kísérlet során kikeltett utódokat (F1, későbbi szülőállomány) felneveltük nyomon követtük fejlődésüket: testtömeg-gyarapodásukat, juvenilis-, prenuptiális- és postnuptiális vedlésüket és az ivarérésüket. A juvenilis vedlést megelőzően a 8. héten vért vettünk az F1 nemzedéktől.

3.2.1.2. Éter stressz kivitelezése

A handling stressz vizsgálat mellé azért választottuk az éter stresszt, mert korábbi irodalmi adatok alapján tudjuk, hogy az éter inhaláció galamb (Péczely, 1972) és házilúd esetében (Kovács és Péczely, 1991) már 2-15 perc csökkenti múlva az *eminentia mediana* CRF tartalmát, illetve 5 perc múlva a plazma ACTH szintjét, valamint a plazma kortikoszteron koncentrációját pedig már 10-15 perc múlva szignifikánsan megemeli. Azaz hirtelen kortikoszteron emelkedés, megjelenik-e a szikben illetve, milyen hatással van az *in ovo* embriófejlődésre, illetve a posztnatális fejlődésre.

Az újabb beavatkozásra a tojástermelés, tojásméret és az állatok viselkedésformáik normalizálódása után került sor. Megfigyeléseink szerint a kísérleti periódust követő két héten belül bekövetkezett.

2002 májusában ugyanazon 2. (stressz) csoportban vizsgáltuk az éter stressz hatását is. A kísérleti csoport tojóival a dietil-éter gőz belélegeztetését 35-60 szekundum időtartamig végeztük, míg a madarak tökéletesen elernyedt állapotba kerültek, ez a rövid altatás az állat egyedi érzékenységétől függően 2-3 percig tartott. Az inhalációt követően 15 perc múlva vérvétel következett. Másnap a kezelést megismételtük. A kezelt csoportban a bélsár- illetve a tojásgyűjtés megegyezett a handling stressznél alkalmazottakkal, s természeten a kontroll a csoportban is azonosan jártunk el.

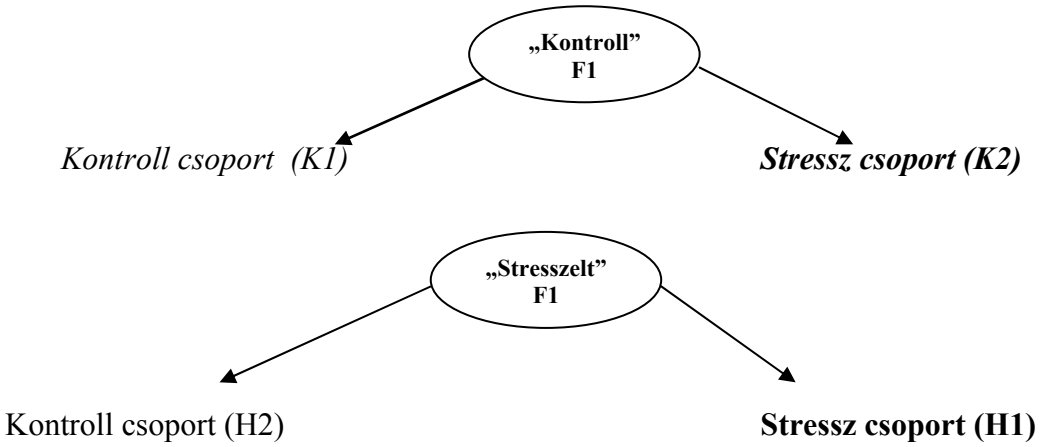
2. táblázat Éter-stressz protokoll

Éter stressz													
05.07	***08.***	*09.*	*10.*	*11.*	*12.*	*13.*	*14.*	*15.*	*16.*	*17.*	*18.*	*19.*	*20.*
éter stressz faeces gyűjtés: 10h; 14h; 18 h		F: 10h	F: 10h	F: 10h	F: 10h	F: 10h	F: 10h	F: 10h	F: 10h	F: 10h	F: 10h	F: 10h	F: 10h
Tojásgyűjtés keltetésre 05. 09-től napi 1-3 db tojás 84 órás inkubálás szik analízis és embrió szexálás													

A tojók bélsár- és plazmamintáit, a tojás-szikmintákat és a juvenilis állatok plazmamintáit is analizáltuk.

3.2.2. 2003-as második évi maternális stresszkezelések, ahol az F1 generáció a szülőállomány

A kontroll és handling kísérleti csoportokból származó F1 nemzedékek vizsgálata az alábbi csoportbontásban történt meg.



Az F1 nemzedék stressz válaszának megállapításához indokoltnak láttuk a handling- és az éter beavatkozások összevetését.

Ebben az évben is ugyanazokat a kísérleti beavatkozásokat alkalmaztuk (ld. ***3.2.1.1***. és a ***3.2.1.2.*** pontok). Márciusban elsőként a handling stressz (*1. táblázat*) vizsgálatot végeztük el, majd áprilisban két hét pihenő időszak után az éter inhalációs vizsgálatokat (*2. táblázat*) teszteltük. A rövidebb, 2 hetes várakozási időt az előző évi eredményeink alapján választottuk, mert ott az ún. pihenő időszakban is keltettük a tojásainkat, a kísérlet befejeződését követő második hetében a kelési eredmények is ismét hasonlóan alakultak, mint a kontroll csoportban.

3.3 Tojásszik szteroid analízis metodikai fejlesztések

A kísérletek alapjául a Schwabl (1993) tojásszik analízisét vettük, a direkt petroléter/ dietiléteres extrakciót. Az extrakciót követően a szteroid ekvivalenseket Radio Immuno Assay (RIA) segítségével határoztuk meg. A metodikai fejlesztéseket az indokolta, hogy az eredeti módszer (Schwabl, 1993) adaptációját követően a tojásszikből kinyerhető kortikoszteron koncentráció igen változatos eloszlást mutatott a különböző fajokban, illetve egyik fajban működött, míg egy másik fajban egyáltalán nem tudtunk mérhető mennyiséget kimutatni.

A kísérleteket megelőzően 5 db inkubálatlan és 5 db embriót tartalmazó tojásból a sziktartalmat eltávolítottuk, homogenizáltuk, lefagyasztottuk és -20°C-on tároltuk a kísérletsorozat kezdetéig. Ez a két poolozott minta szolgált az összes metodikai vizsgálatok alapjául.

Háromféle extrakciót próbáltunk ki, kétféle detergenssel kombinálva. A szerves oldószerek a következők voltak: dietil-éter (Reanal), petroléter (Reanal), a detergensek: a nem-ionos Triton-X-100 (Reanal) és az ionos a SDS (sodium-dodecyl-sulphate, Sigma).

3.3.1. Direkt dietil-éteres extrakció

Az extrakciót megelőzően 2000 CPM-nek megfelelő 20 µl mennyiségű ^{3}H-tesztoszteron mértünk be az extraháló üvegcsövekbe, majd beszárítottuk. Erre a műveletre azért van szükség, hogy ellenőrizhessük az extrakciós visszanyerést. 0,5 gramm szikmintát mértünk a csövekbe és 500 µl desztillált vízzel vortex-mixerrel homogenizáltuk, ezt követően szobahőmérsékleten 0,5 órát állni hagytuk. A keveréket ötszörös mennyiségű szolvenssel (5ml dietil-éter/ minta) extraháltuk, 20 percig rázattuk, majd –20°C-ra tettük és így a víz és a szik keveréke megfagyott és ezután egyszerűen csak leöntöttük a felülúszót a Wassermann kémcsövekbe. Az extrakciót háromszor végeztük el. A kémcsövekben lévő extraktumukat beszárítottuk és 500 µl absz. etanolban újra feloldottuk, így 1 µl etanolos oldat felel meg 1 mg tojássziknek. Az alkoholos extraktum 1/10-ét szcintillációs küvettákba mértük, ennek segítségével határoztuk meg az extrakciós recovery-t. Az extraktumokat a következő hígítási sorban határoztuk meg: 1,25 mg, 2,5 mg, 5 mg, 7,5mg, 10 mg, az analízist egy assay-ben és triplettekben végeztük el. A RIA kivitelezését *lásd később a 3.7. pontban*.

3.3.2. Direkt petroléter/dietil-éteres extrakció

Minden részlet megegyezik a fent említett direkt dietil-éteres extrakcióval, csak a szolvens különbözött. Ebben az esetben a háromszoros extrakciót 5 ml petroléter/dietil-éter (30:70 v%-os) elegyével végeztük.

3.3.3. Dietil-éter extrakció SDS-es emulzifikációval kiegészítve

Minden részlet megegyezett az 1. pontban leírt direkt dietil-éteres extrakcióval, csak a desztillált vízzel történő homogenizálás után 200 µl 1%-os SDS oldatot használtunk, ezután vortex-mixer segítségével alaposan összekevertük, és fél órát állni hagytuk.

A detergens segítségével a neutrális zsírokat emulgeáltuk, ami lehetővé tette, hogy a későbbi extrakció során a szteroid kivonás hatékonyabb legyen, az SDS emulgeálást fekális szteroid analíziseknél dolgoztuk ki (Kelemen et al., 2003).

3.3.4. *Dietil-éter extrakció Triton-X-100-as emulzifikációval kiegészítve*

Minden megegyezett az előbbieknél leírtakkal, azonban a detergens itt Triton-X-100 1%-os oldata, ugyanolyan mennyiségben és módon használtuk (200 µl, félóraállás). A cél egy kevésbé agresszív ún. nem-ionos detergens alkalmazása volt.

3.3.5. *Petroléter/dietil-éteres extrakció SDS-es emulzifikációval kiegészítve*

Minden megegyezett a fent említett direkt petroléter/dietil-éteres extrakciónál alkalmazottakkal, csak kiegészítettük az SDS-es előkezeléssel (200 µl 1%-os SDS oldat, félóra állás).

3.3.6. Petrol*éter/dietil-éteres extrakció Triton-X-100-as emulzifikációval kiegészítve*

Itt is minden megegyezett az előzővel, csak a detergens különbözött, mivel 1%-os Triton-X-100 oldatot használtunk 200 µl mennyiségben.

3.4 Tojás-biopszia vizsgálatok

Ezen vizsgálataink arra irányultak, hogy megállapítsuk a tojó által a szikbe deponált T és E2 mennyiségének változásait az inkubáció alatt. Vizsgáltuk hányadik napig mehetünk el az inkubáció során, amíg az eredeti, a tojó által allokált szteroid mennyiségeket tudjuk kimutatni. Későbbi vizsgálati periódusban ellenőriztük a szik-kortikoszteron koncentráció változásait is az inkubáció 8. napjáig.

A tojásokat a szikminta-vétel előtt mindig fertőtlenítettem Betadine® oldattal, majd ezt követően a légkamra felől egy steril 18G 1″ tű és 2 ml-es fecskendő segítségével 20-30 mg szikmennyiséget vettem ki a keletkezett vákuum segítségével. A szikmintákat mindig a szik közepéből vettem, a tű helyzetét két tojáslámpázó segítségével ellenőriztem, így volt megoldható, hogy ne sértsem meg sem a fejlődő embriót, sem pedig a blasztoderma ereit. A sikeres és legalább 15 elemszámot elérő vizsgálatainkat a keltetés 8. napjáig végeztem. Ahhoz hogy 15 embrió a 0. naptól a 8. napig nyomon követhető legyen, a kísérletben résztvevő tojások száma 96 db volt, egyrészük azért esett ki, mert terméketlennek bizonyult, másrészük pedig a korai embrió elhalás

miatt. Harmadrészt pedig a mintavétel következtében néhányszor (6 esetben) a fejlettebb embrióknál megsérült a blasztoderma egy nagyobb méretű ere és ennek következtében szinte azonnal elvéreztek. A tojásokból inkubálás előtt vett szik minták szteroid koncentrációit vettük száz százaléknak, ehhez viszonyítottam a keltetés különböző napjain mért értékeket és ezt százalékban fejeztem ki (24 óránként történt a mintavétel, n=15). A biopsziával nyert szikmintákat -20 C-on tároltuk a szteroid analízisekig.

3.5 Fekális szteroid analízis metodikai fejlesztések

A metodikai módosításokra egyrészt azért volt szükség, mert a viziszárnyasok bélsarában igen eltérő a víztartalom és ezt a hibát kiküszöbölve kellett olyan módszert kidolgozni, amely kizárja az egyes minták közti különbségeket. 10 nedves bélsármintát homogenizáltunk és 0,5 grammos adagokra szétosztottuk, a minták egy részét homogenizáltuk 200 µl 1 %-os SDS oldattal, majd súlyállandóságig szárítottuk. Összehasonlítottuk az abszolút száraz és nedves minták tesztoszteron tartalmát.

Másrészt a stressz vizsgálatoknál, kerülendő az extra zavarás (pl.: vérvétel), így kizárólag bélsáranalízisekre támaszkodhatunk. Vizsgáltuk, hogy a plazmában mérhető szteroid ekvivalensek, mikor jelennek meg a bélsárban.

Harmadrészt, az eddigi irodalom szinte kizárólag csak hímekben vizsgálta a plazma –bélsár „fáziskésést”. Korábban munkacsoportunkban tőkés réce gácsérokon vizsgáltuk a plazma-faeces fáziseltolódást, és kiderült, hogy a korábbi irodalmak alapján feltételezett 4 óra hibás volt.

3.5.1. Tesztoszteron terhelés hatása a defekációra

A tesztoszteron-terhelést hatását vizsgáltuk a fekális tesztoszteron ürülés kinetikájára. Kísérleteinkben 10 tojót és 10 gácsért vizsgáltunk a reprodukciós (május) és posztrefrakter (október) időszakban. A kísérlet kezdete előtt 48 órával egy tojót és egy gácsért egy külön boxban (2x3 m) helyeztünk el, amelynek padozatát polietilén fóliával fedtük le a könnyebb faeces mintavétel érdekében. Ezáltal egyszerűbben megoldható a padozat takarítása és elkerülhető a különböző egyedektől származó minták esetleges keveredése.

3.5.1.1. Takarmány-áthaladás vizsgálatok

Adott mennyiségű tojótápot tömésre előkészítettünk, majd nem toxikus és nem laxáns hatású –emberi fogyasztásra is alkalmas- mesterséges ételszínezékkel (E102-tartrazin, synthetic yellow, E133-Brillant Blue, E211-Sodium benzoate, E330-citric acid) megfestettünk, így könnyen nyomon

követhető volt a két ivar által ürített faeces. Az állatok tömését követően folyamatosan figyelemmel kísértük az ürülést az első színezett bélsár megjelenésétől a már nem színezett bélsár észleléséig.

3.5.1.2. Tesztoszteron terhelés

Minden alkalommal a T injekció beadása előtt kontroll vér- és faeces mintát gyűjtöttünk az állatoktól. A kontroll minták begyűjtése után mindkét állatnak az élettani T-szint 100x-át (5µg T/2ml) tartalmazó T injekciót adtunk intraperitoneálisan (i.p.). Ezt követően 8 órán keresztül folyamatosan gyűjtöttük az összes bélsár mintát, az egyes minták begyűjtése után alaposan letisztítottuk a fóliát a keveredés kivédése érdekében. A bélsár gyűjtését vérvétellel egészítettük ki, a T injekciót követően először félóra múlva, majd 2 óránként vettünk vért. A minták kezelése és tárolása a későbbiekben részletesen kerül kifejtésre (3.7.2. pontban).

3.6. A 84 órás inkubálás után embrionális szövetminta és tojásszik-minták gyűjtése

A tojásokat kisméretű főzőpohárba állítva, a héj felső 1/5-ét - alkoholos lemosás után - csipesszel feltörtük, majd az embriót – státuszának megállapítása után – steril, tompa csipesszel óvatosan eltávolítottuk, majd steril Eppendorf csőbe helyeztük. Az eszközöket két embrió között alkoholos mosással és alkoholos égetéssel tisztítottuk. Az embrió eltávolítása után a szikanyagot homogenizáltuk, és ebből szintén Eppendorf csövekbe, vágott hegyű pipettával gyűjtöttünk mintát. Az embrionális szövetmintákat -70°C-on, a szikmintákat -20°C-on tároltuk a további analízisekig.

Az embrió státuszának kategóriái:

- **0: elhalt embrió**: D2-D3 fejlettségi fokú embriókból vettünk szövetmintát szexáláshoz.
- **1: élő, de abnormális fejlődést mutató embrió**: a blasztoderma szélén véres beszűrődés látható, elhaló embrió.
- **2: élő, de az átlagosnál kisebb embrió**: normálisan fejlett, de a normális méretnél kisebb (1,5-2 cm átmérőjű) blasztoderma.
- **3: normál fejlődésű embrió**: a blasztoderma 3-4 cm átmérőjű; a keringés és a szívműködés megindult.

3.7. Szexuálszteroidok és kortikoszteron mennyiségi meghatározása ^{3}H-RIA módszerrel

A vizsgálat során vérplazmából, bélsárból valamint tojásszikből szteroid hormonok meghatározását végeztük, RIA módszerrel.

A tesztoszteron (T) RIA kivitelezése Jallageas módszere (1975) szerint; a dehidro-epiandroszteron (DHEA) RIA kivitelezése Fehér Tibor módszere (szóbeli közlés, 1999) szerint, a kortikoszteron (B) RIA kivitelezése Mihály Katalin módszere (Péczely és Pethes, 1981) szerint. A progeszteron (P4) RIA kivitelezése *Abraham* és mtsai módszere (1971) szerint, és végül a 17-β-ösztradiol (E_2) RIA kivitelezését a *Mikhail* és mtsai (1970) módszerének megfelelően különböző mennyiségű extraktumokból végeztük el.

3.7.1. A meghatározás plazmából, mintavétel

A különböző szteroidokat a különböző vizsgálati- és kísérleti időpontokban a különböző korú és ivarú tőkés récék szárnyvénájából (*vena brachialis*) vett 0,5-2 ml mennyiségű vérmintákból határoztuk meg. A vért heparinozott csövekbe vettük, majd az alakos elemeket centrifugálással (3500/min fordulatszám) szeparáltuk a plazmától. A plazmamintákat felhasználásig -20°C-on tároltuk. Az extrakciót követő visszanyerést ^{3}H-kortikoszteron illetve ^{3}H-tesztoszteron hozzáadásával mértük, az átlagos visszanyerés: kortikoszteron esetében: 94,67±4,88 % , szexuálszteroidok esetében pedig 96,16±3,87 % volt.

3.7.2. Meghatározás bélsármintákból, mintavétel

A lefagyasztott és felolvasztott bélsár mintákat homogenizáltuk, majd súlyállandóságig szárítottuk, ezzel mintegy kiküszöbölve a különböző bélsár minták eltérő víztartalmából eredő hibákat.

A bélsár kortikoszteron kinyeréséhez háromszoros diklórmetános extrakciót, a szexuálszteroidok esetében pedig dietil-étert alkalmaztuk, melyet mindkét esetben az extrakciót megelőzően 1%-os SDS delipidizációval egészítettük ki. Először 10-szeres volumenű dietil-éteres rázatás történt 3x30 percen keresztül, majd az oldószeres fázisok egyesítése, bepárlása, absz. etanolos felvétele. Az extrakciót követő visszanyerést ^{3}H-kortikoszteron illetve ^{3}H-tesztoszteron hozzáadásával mértük, az átlagos visszanyerés: kortikoszteron esetében: 68,77±5,34 %, szexuálszteroidok esetében pedig 69,96±4,32 % volt. A bélsár szteroid ekvivalensek detektálása Radio Immuno Assay (RIA) segítségével 0,5 mg abszolút száraz mintából történt.

3.7.3. Meghatározás szikmintákból

A szik kortikoszteron kinyeréshez is a háromszoros diklórmetános extrakciót, illetve a szexuálszteroidok esetében pedig dietil-étert alkalmaztuk, melyet mindkét esetben az extrakciót megelőzően 1%-os Triton-x-100 emulgeálással egészítettük ki. Az extrakció többi lépése megegyezett a ***3.7.2*** pontban leírtakkal. Az extrakciót követő visszanyerést itt is ^{3}H-kortikoszteron

illetve ^{3}H-tesztoszteron hozzáadásával mértük, az átlagos visszanyerés: kortikoszteron esetében: 74,11±9,02 %, szexuálszteroidok esetében pedig 78,93±8,22 % volt. A szikszteroid ekvivalensek detektálása Radio Immuno Assay (RIA) segítségével 2,5 mg mintából történt.

RIA kivitelezése

Foszfát-puffer:

Foszfát-puffer pH 7,4-7,6
A komponens: 1,095g NaH_2PO_4. $2H_2O$ + 80 ml bideszt.víz
B komponens:15,0525g $Na_2HPO_4.2H_2O$ + 420ml bideszt.víz

A+B komponens (500 ml), ebben feloldani 0,05 g zselatint.

Kötőanyagok az egyes szteroidok szerint:

Tesztoszteron:

20 ml puffer
100 µl ^{3}H –tesztoszteron Testosterone, [1,2,6,7-^{3}H] [American Radiolabeled Chemicals, Inc.: ART 0768]
60000-szeres hígítású T-antitest : 33µl

Poliklonális T antiszérum BSA-tesztoszteron-3-hemszukcináttal szemben fejlesztették ki (Peter Sharp, Edinburgh U.K). Érzékenység: 10 pg/cső, intra- assay 6–9% -, inter assay 5–8%.
Keresztreakciói: T: 100%, epiandroszteron: 38,89%, 5α-androsztén-3α,17β-diol: 60,89%, 4-androsztén-3,17-dion 36,73%, Δ5-androsztén-3β-17β-diol: 43,33%, dehydro-iso-androszteron-3-szulfát: 17,22%, etiokolan-17β-ol-3-on: 33,68%, 5α-androstén7β-ol-3-on: 64,43%, 5β-androsztén-3α,17β-diol 12,35%, 17β-ösztradiol: 3,00%, 17α-hydroxi-progeszteron: 1,50%, progeszteron: 1,00%.

Dehidro-epiandroszteron:

20 ml puffer
100 µl ^{3}H -dehidroepiandroszteron, Dehydroepiandrosterone, [1,2-^{3}H] [American Radiolabeled Chemicals, Inc.: ART 1171]
500-szoros hígítású DHEA-antitest: 1 ml
Poliklonális DHEA antiszérum BSA-dehydroepiandrosteron-3-hemiszukcináttal szemben fejlesztették ki (Fehér Tibor, Budapest, Magyarország). Érzékenység: 10 pg/cső, intra- assay 6–8%, inter assay 9-12%.
Keresztreakciói: DHEA: 100%; DHEA-S: 89%; androszteron: 26%, etiokolanolon: 7%. A magas fokú keresztreakció a DHEA-szulfáttal nem zavarja a DHEA meghatározást, mivel a DHEA-S nincs jelen a madár szteroid metabolizmusában.

17-β- ösztradiol:

20 ml puffer
100 µl ^{3}H -ösztradiol, Estradiol, [2,4,6,7-^{3}H] [American Radiolabeled Chemicals, Inc.:ART 1555]
20000-szeres hígítású E2-antitest: 50 µl
Poliklonális E2 antiszérum BSA-17- β ösztradiol-hemiszukcináttal szemben fejlesztették (Peter Sharp, Edinburgh, U.K.). Érzékenység: 10 pg/cső, intra- assay 9-11%, inter assay 7-9%.

Keresztreakciói: E2: 100%; ösztron: 70%; kortizol: 5%; P4: 1%; 17α-hidroxi-progeszteron: 1%; T: 1%.

Progeszteron:

20 ml puffer
100 µl ^{3}H -progeszteron, Progesterone, [1,2,6,7,16,17-^{3}H] [American Radiolabeled Chemicals, Inc.: ART 1134]
5000-szeres hígítású P4-antitest: 100 µl
Poliklonális P4 antiszérum BSA-11-OH-progeszteron-hemiszukcináttal szemben fejlesztették ki. (Peter Sharp, Edinburgh, U.K.). Érzékenység: 10 pg/cső, intra- assay 4-6%, inter assay 5-7%.
*Keresztreakciói:*P4: 100%; 17α-hydroxi-progeszteron: 75%; kortizol: 10%; T: 1%; 17α-hidroxi-progeszteron: 1%; T: 1%.

Kortikoszteron:

20 ml puffer
100µl ^{3}H -kortikoszteron, Corticosterone, [1,2,6,7-^{3}H] [American Radiolabeled Chemicals, Inc.: ART 0652]
500-szoros hígítású B-antitest: 4 ml
Poliklonális antitest: Corticosterone -3-CMO-BSA (ACRIS Antibodies GmbH, Hiddenhausen, Németország). Érzékenység: 10 pg/cső, intra- assay 5-6%, inter assay 7-9%.
Keresztereakciói: Kortikoszteron 100%, 11-DeoxyKortikoszteron 9%, Progeszteron 0.2%, 17- α –hidroxy-progeszteron <0.01%, 11-Deoxikortizol <0.01%, Kortizol <0.01%, E2 <0.01%, Tesztoszteron <0.01%

Szcintillációs koktél:

toluol-Triton-X-100
PPO-POPOP primer és szekunder Szcintillátor

Aktív szén (Charcoal) Dextrán T-70-nel bevonva.

A meghatározás menete:
A különböző mintákból (plazma, bélsár, tojásszik) nyert szteroid tartalmú alkoholos extraktumokat szárazra pároltuk, majd a ^{3}H jelölt szteroidokat és a specifikus antiszérumot tartalmazó foszfát puffer aliquotjával Vortex-mixerrel szuszpendáltuk. Egy éjszakán át +4°C-os tárolást követően a szteroid tartalmú oldatokból a Charcoal-os szeparálással különítettük el az antiszérumhoz kötött ún. kötött (bound) és a szabadon maradt (free) radioaktivitást. A szabad radioaktivitást, illetve az antiszérumhoz nem kötött szteroidokat a Dextrán-T-70-nel kezelt aktív szénszemcsék abszorbeálták és ezt a hűthető centrifugálással tökéletesen el lehetett szeparálni. A felülúszó leszívásával és mérőküvettákba történő mérésével lehetőség adódott annak a kötött radioaktivitásának meghatározására LKB-Wallack típusú Scintillációs Spektrométer segítségével.

A fenti módszerrel (amelyet a módszerek beállításakor elvégzett „kereszt reakciókkal” teszteltünk) 4 szexuálszteroid és kortikoszteron szintjét tudtuk nagy érzékenységgel (10 pg/cső) és specificitással meghatározni.

A Szcintillációs Spektrométer által lemért kötött radioaktivitásokból, standard görbékhez viszonyítva, a Tanszék által szerkesztett Excel alkalmazás segítségével meghatároztuk az 1g tojásszikre / 1g abszolút száraz bélsárra / 1ml plazmára vonatkoztatott szexuálszteroid koncentrációkat.

3.8. A genetikai ivarmeghatározás menete

A vizsgálatok során eltávolított embriókból Chelex 100 (Bio Rad) extrakcióval genomiális DNS-t izoláltunk *(Walsh és mtsai., 1991)*. Az így kapott mintákból 2-2 µl-t vettünk ki a PCR-ral történő felszaporításhoz, melyet a Perkin Elmer Gene Amp 2700-as típusú készülékkel végeztünk.

A genetikai ivar meghatározásához belső kontrollként a W és Z ivari kromoszómákon egyaránt megtalálható *spindlin* gént használtuk. A W kromoszóma hosszú karján található 0,6 kb hosszú *Eco*RI (EE0,6) fragmentet használtuk a W kromoszóma jelenlétének kimutatására. Ez a DNS régó nagyon specifikus a W kromoszómára.

A reakció a következő feltételek között zajlott:

A reakció térfogata: 50 µl

A reakcióelegy összetétele:

0,2 mM mindegyik dNTP-ből
40 pM mindegyik primerből
2,5 unit Taq polimeráz (Promega)
2,5 mM $MgCl_2$
5 µl 10 x PCR puffer (Promega)

PCR-primerek:

A genetikai ivar meghatározásához használt PCR reakcióban a *spindlin* génre tervezett INT-F és INT-R primerek által adott 246 bp hosszú amplikon szolgált a reakció kontrolljaként, hiszen ez a gén nem ivarspecifikus, így mindkét nemben ad terméket a primerekkel. A W specifikus EE0,6 régióra tervezett AWS03 és USP3 primerek amplikonjának hossza 190 bp. Ez csak akkor detektálható, ha W kromoszómája is volt az embriónak, azaz nőivarú (Itoh et al., 2001).

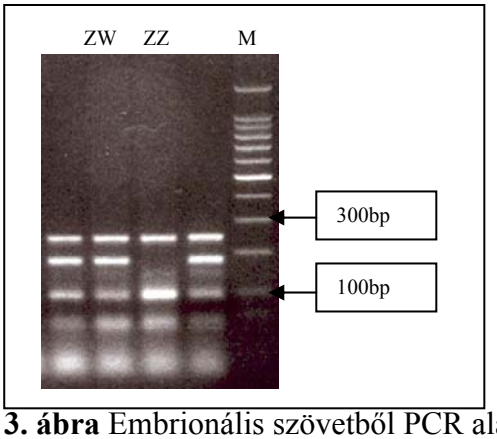
A primerek nukleotid sorrendje:

INT-F: ATAGAAACAATGTGGGAC
INT-R: CTCTGTCTGGAAGGACTT

Reakciókörülmények:

95 °C	5 perc	
95 °C	80 másodperc	35 ciklus
56 °C	90 másodperc	
72 °C	60 másodperc	
72 °C	5 perc	

A reakció során képződött termékeket 2 w/v % -os agaróz-gélben futtattuk 1X TBE pufferben, majd etidium-bromidos festés és UV lámpa segítségével tettük láthatóvá az elválasztott frakciókat. A kapott mintázatokat az első két zsebbe felvitt, egy hím (ZZ) és egy tojó (ZW) állatnak megfelelő kontrollhoz hasonlítottuk.



3. ábra Embrionális szövetből PCR alapú szexálás gél-elektroforézis.
ZZ: hímembrió, ZW: nőivarú embrió M: molekulatömeg marker

3.9. Statisztikai analízis

Az adatokat átlag±sd formában ábrázoltuk. Az adatok statisztikai elemzését a Microcal Origin szoftver 3.5-ös verzió segítségével végeztük el.

Lineáris regressziót alkalmaztunk a tojástömeg és a szik kortikoszteron összefüggéseinek összehasonlítására. Bélsár szteroid össz-produktum összehasonlítását a görbe alatti terület kiszámolásával (integrálás), majd a kontroll csoportok százalékában fejeztük ki. A tojástömeg, testtömeg, a szik-, ill plazmaszteroid koncentrációk összehasonlítását ANOVA segítségével végeztük el. Az adatok mindenhol normál eloszlást mutattak, így az adatokat nem transzformáltuk.

4. EREDMÉNYEK

4.1. Tojásszik analízis metodikai fejlesztések, metodika kiválasztás

A kísérleteket az inkubált tojások szikanyagával kezdtük, hiszen kísérleteink, együttműködéseink javarészt ún. „embriós tojás” analízisekre korlátozódnak.

A metodikai tesztelést tesztoszteronnal végeztük, hiszen irodalmi adatokból tudjuk, hogy ez a szteroid található legnagyobb mennyiségben a szikben (Schwabl et al., 1997), valamint a korábbi faeces metodikai vizsgálatainkban is a T-t használtuk (Kelemen et al., 2003).

Minden mérést 3X3-as ismétlésben végeztünk a legrosszabb párhuzamosaink az 5, 7,5 és 10 mg-os kiindulási mennyiségű mintáinkból lettek, ebben az esetben 10% (9,35%) belül estek, míg az 1,25 és 2,5 mg-os hígításoknál ±5%-on belül (4,69%) voltak. A legjobb párhuzamosakat a 2,5 mg-os hígításoknál kaptuk.

Az absz. etanolban reszolveált extraktumokból 1,25 mg, 2,5 mg, 5 mg, 7,5 mg és 10 mg mennyiségekkel végeztük el a radioimmnunoassay-t, majd a pg-ban kapott koncentrációkat felszoroztuk ng T/ 1g szik értékre. Így hasonlítottuk össze a különböző extrakciós eljárásokat.

3. táblázat Az inkubált tojások abszolút tesztoszteron tartalma
A legkisebb tesztoszteron veszteséget a 1.25 mg-os és a 10 mg-os kiindulási mennyiséget tekintve a dietil-éteres extrakció Triton-X-100 emulzifikációs eljárásnál kaptuk.

Minta kiindulási mennyisége (RIA)	**1,25 mg**	**2,5 mg**	**5 mg**	**7,5 mg**	**10 mg**
Direkt dietil-éter extrakció T **ng/ 1g szik**	139,56	66,92	52,86	37,43	34,92
Direkt petroléter/ dietil-éter extrakció **T ng/1g szik**	83,88	42,86	38,55	31,10	24,90
Dietil-éter extr+ SDS **T ng/1g szik**	122,82	96,45	68,31	61,35	63,91
Dietil-éter extr. + Triton-X-100 **T ng/1g szik**	**111,28**	**104,63**	**92,29**	**81,80**	**74,40**
petroléter/ dietil-éter extr + SDS **T ng/1g szik**	68,99	55,28	38,94	33,66	28,65
petroléter/ dietil-éter extr + Triton-X-100 **T ng/1g szik**	80,86	65,61	57,12	50,94	37,51
Átlag **T ng/1g szik**	86,95	62,04	50,44	43,39	39,18
Szórás	*27,53*	*23,91*	*20,25*	*19,60*	*20,23*

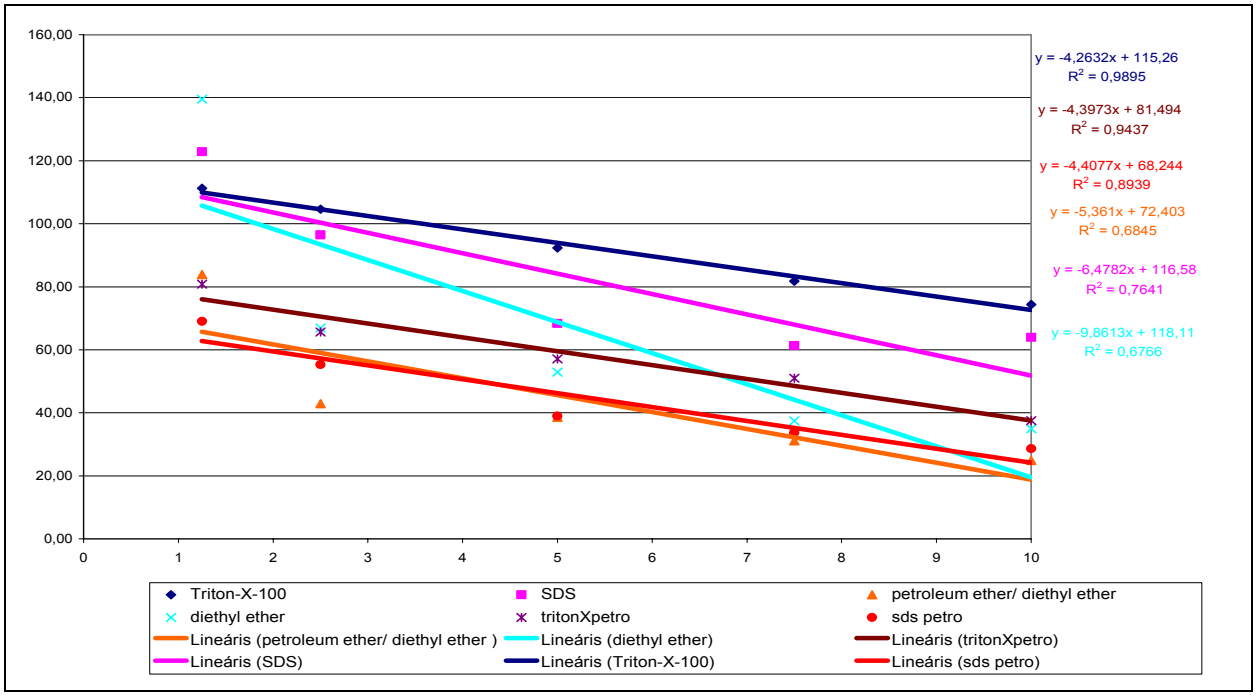
Látható, hogy nagyon nagy az abszolút értékek közt a szórás, így az összes mért koncentrációt az 1,25 mg kiindulási mennyiségből mért T koncentrációhoz hasonlítottuk, tehát ezt az értéket vettük 100 százaléknak és a többit ehhez viszonyítottuk.

4. táblázat Az inkubált tojások százalékos tesztoszteron tartalma
A leghatékonyabb extrakciós eljárás: a dietil-éteres extrakció + Triton-X-100 emuzifikáció (legkisebb extrakciós veszteség).

Minta kiindulási mennyisége (RIA)	**1,25 mg**	**2,5 mg**	**5 mg**	**7,5 mg**	**10 mg**
Direkt dietil-éter extrakció **%**	100,00	47,95	37,87	26,82	25,02
Direkt petroléter/ dietil-éter extrakció **%**	100,00	51,10	45,96	37,08	29,69
Dietil-éter extr+ SDS **%**	100,00	78,53	55,61	49,95	52,03
Dietil-éter extr+ Triton-X-100 **%**	**100,00**	**94,02**	**82,94**	**73,51**	**66,86**
petroléter/ dietil-éter extr + SDS**%**	100,00	80,13	56,44	48,79	41,53
petroléter/ dietil-éter extr + Triton-X-100 **%**	100,00	81,14	70,64	63,00	46,39

A fenti táblázatok jól mutatják a különböző extrakciós eljárások közti jelentős különbségeket, valamint kiderül az is, hogy a vizsgált metodikák közül a dietil-éteres extrakció Triton-X-100 emulgeálással kiegészítve tűnik a leghatékonyabbnak.

Továbbá ellenőriztük a görbék meredekségét is, hiszen - optimális esetben- olyan lineárist kellene kapnunk, melynek meredeksége: 0.



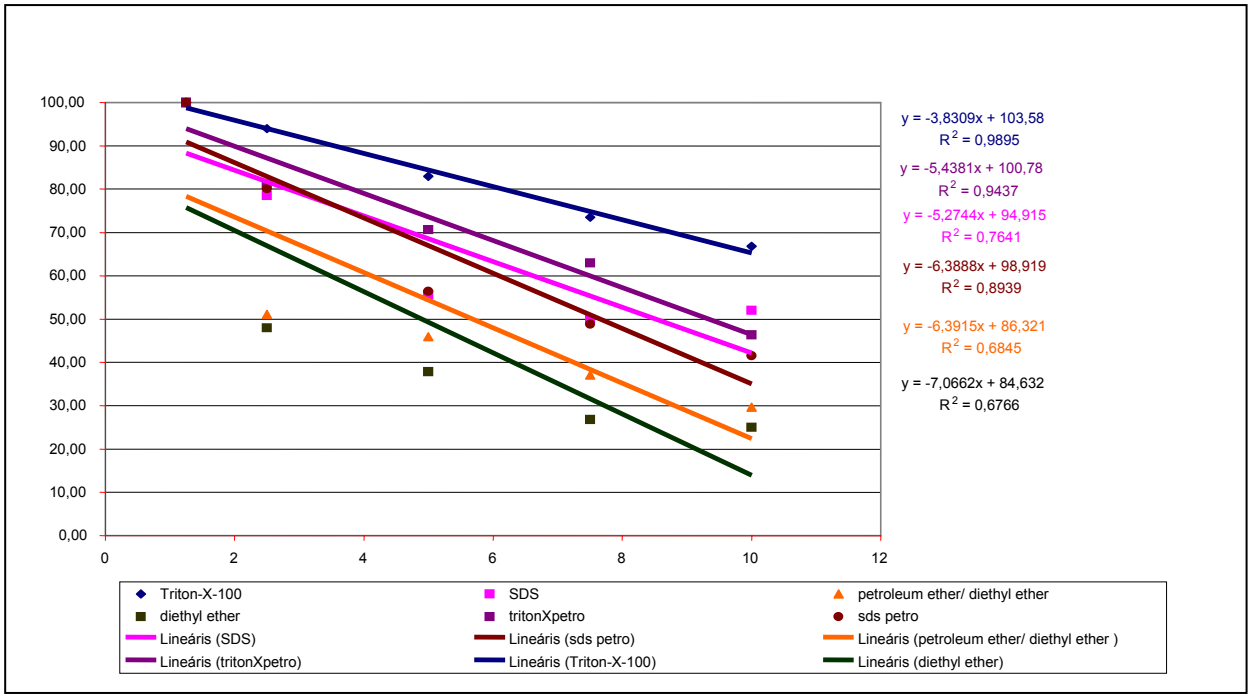
4. ábra Az inkubált szikből különböző extrakciós eljárásokkal kinyert abszolút T koncentrációk (ng/g) eltérő kiindulási mennyiségek esetén.
Legkisebb meredekség: a dietil-éteres extrakció+ Triton-X-100 eljárás (m= -4,26).

A fenti (***4.***) ábrából is kiderül, hogy igen nagy eltérések vannak a különböző extrakciós módszerek között.

Meredekség alapján felállítható sorrend:

1. dietil-éter+Triton-x-100: m= -4,26
2. petroléter/dietil-éter+ Triton-x-100: m= -4,39
3. petroléter/dietil-éter+SDS: m= -4,41
4. direkt petroléter/dietil-éter: m= -5,36
5. dietil-éter+SDS: m= -6,48
6. direkt dietil-éter: m= -9,86

Jobban összehasonlítható a százalékban kifejezett értékek ábrázolása (*5. ábra*).



5. ***ábra*** Az inkubált szikből különböző extrakciós eljárásokkal kinyert relatív (százalékos)T koncentrációk (ng/g) eltérő kiindulási mennyiségek esetén
A legkisebb meredekség: a dietil-éteres extrakció+ Triton-X-100 eljárás (m= -3,83).

Meredekség alapján felállítható sorrend:

1. dietil-éter+Triton-x-100: m= -3,83
2. dietil-éter+SDS: m= -5,27
3. petroléter/dietil-éter+ Triton-x-100: m= -5,43
4. petroléter/dietil-éter+SDS: m= -6,38
5. direkt petroléter/dietil-éter: m= -6,39
6. direkt dietil-éter: m= -7,06

A legkisebb meredeksége a Triton-X-100-zal kombinált dietil-éteres extrakcióval nyert értékeknek van, mindkét ábrázolási mód esetén is.

5. táblázat Extrakciós recovery az embriót tartalmazó tojások vonatkozásában.
Azonosan alakult mind a hat extrakciós eljárás esetében.

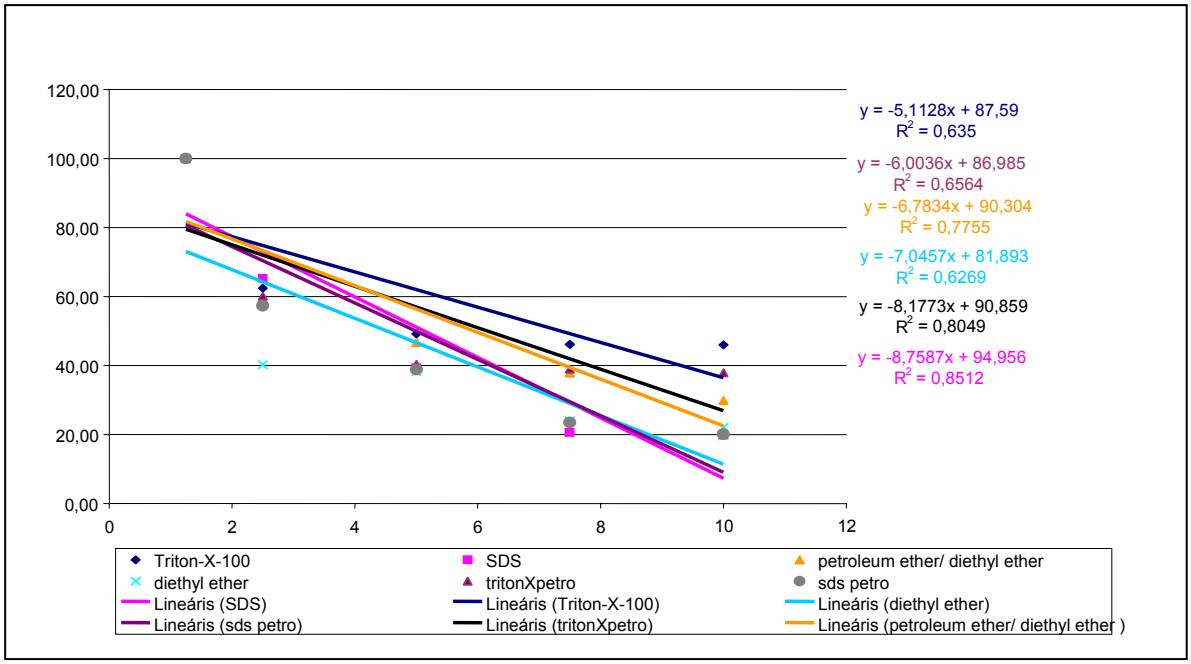
Extrakciós eljárás	Recovery % (n=9)
Direkt dietil-éteres extrakció	67,31±0,76 %
Direkt petroléter/dietil-éteres extrakció	68,32±0,84 %
Dietil-éter + Triton-X-100	69,24± 0,86 %
Dietil-éter + SDS	67,81±0,57 %
Petroléter/dietil-éter +Triton-X-100	68,99±0,84 %
Petroléter/dietil-éter +SDS	68,03±0,79 %

Az extrakciós recoveryben nem találtunk szignifikáns különbséget (ANOVA: F=1,75, p=0.25).

Az inkubálatlan tojásoknál lényegesen nagyobb a veszteség, a kiindulási mennyiség növelésével (*6. táblázat*).

6. táblázat Tesztoszteron relatív (százalékos) értékek inkubálatlan tojásokból
A leghatékonyabb extrakciós eljárás: a dietil-éteres extrakció + Triton-X-100 emuzifikáció (legkisebb extrakciós veszteség).

Minta kiindulási mennyisége (RIA)	1,25 mg	2,5 mg	5 mg	7,5 mg	10 mg
Direkt dietil-éter extrakció **%**	100,00	40,21	38,16	24,05	22,09
Direkt petroléter/ dietil-éter extrakció **%**	100,00	59,18	46,66	37,77	29,85
Dietil-éter extr+ SDS **%**	100,00	65,22	39,25	20,62	19,77
Dietil-éter extr+ Triton-X-100 **%**	**100,00**	**62,46**	**49,21**	**46,13**	**45,94**
petroléter/ dietil-éter extr + SDS **%**	100,00	57,33	38,76	23,44	20,11
petroléter/ dietil-éter extr + Triton-X-100 **%**	100,00	60,11	40,34	38,99	37,89



6. ábra Az intakt szikből különböző extrakciós eljárásokkal kinyert relatív (százalékos) T koncentrációk (ng/g) alakulása eltérő kiindulási mennyiségek esetén
A legkisebb meredekség: a dietil-éteres extrakció+ Triton-X-100 eljárás (m= -5,11).

Meredekség alapján felállítható sorrend:

1. dietil-éter+Triton-X-100: m= -5,11
2. petroléter/dietil-éter+ Triton-X-100: m= -6,00
3. direkt petroléter/dietil-éter: m= -6,78
4. direkt dietil-éter: m= -7,04
5. petroléter/dietil-éter+SDS: m= -8,17
6. dietil-éter+SDS: m= -8,75

A fenti adatokból látszik, hogy inkubálatlan tojásoknál is a dietil-éteres extrakció Triton-X-100 as emulzifikálással előkezelve tűnik a leghatékonyabb eljárásnak.

7. táblázat Extrakciós recovery százalékok inkubálatlan tojásnál.
Leghatékonyabb kinyerés: a dietil-éteres extrakció+ Triton-X-100 eljárás.

Extrakciós eljárás	**Recovery % (n=9)**
Direkt dietil-éteres extrakció	66,55±0,74 %
Direkt petroléter/dietil-éteres extrakció	67,78±0,87 %
Dietil-éter + Triton-X-100	**68,05± 0,45 %**
Dietil-éter + SDS	65,95±0,65 %
Petroléter/dietil-éter +Triton-X-100	66,93±0,69 %
Petroléter/dietil-éter +SDS	67,68±0,72 %

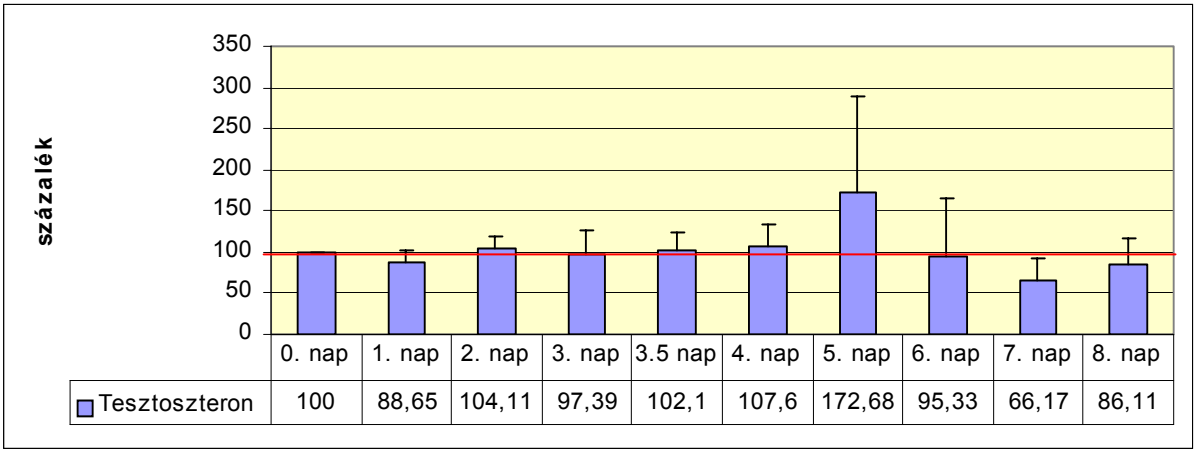
Az extrakciós recoveryben -ellenben az embriós tojásoknál- itt találtunk szignifikáns különbséget, a legjobb visszanyerést a dietil-éter + Triton-X-100 extrakciós módszernél kaptuk (ANOVA: F=6,71, p=0.011).

A fentiek alapján a dietil-éteres extrakció Triton-X-100-as emulzifikációval előkészítve eljárást illetve a 2.5 mg szikmintának megfelelő extraktumból történő analízist választottuk a tőkés réce tojásszteroid meghatározásaira. A többi általunk analizált szteroid (B, DHEA, E2, P4) esetében is megfelelőnek bizonyult ez az extrakció és a 2,5 mg-os kiindulási mennyiség.

4.2. A szik szteroid tartalmának változásai az inkubáció első nyolc napjában

A tojó által deponált T, E2 és B mennyiségének meghatározására és az embrionális felvétel ellenőrzésére megvizsgáltuk, hogyan változik a szikben ezen szteroidok koncentrációja az inkubáció során. A 84 órás inkubációs időt, azért választottuk, mert ekkor már 3-4 cm a blasztoderma átmérője és 0,7-0,9 mm az embrió hossza, tehát könnyen eltávolítható. Továbbá ekkor már kevesebb szikanyagot tartalmaz az embrionális szövetminta és ez megkönnyíti a DNS extrakciót a későbbi szexáláshoz. Másrészt folyamatos biopsziával ellenőriztük a szik szteroid tartalmának változását, hogy ellenőrizzük, hogy a 3,5 napig (84 óráig) inkubált tojásoknál a szikben levő szteroid koncentráció tükrözi-e még az eredeti az „anyai befektetést”.

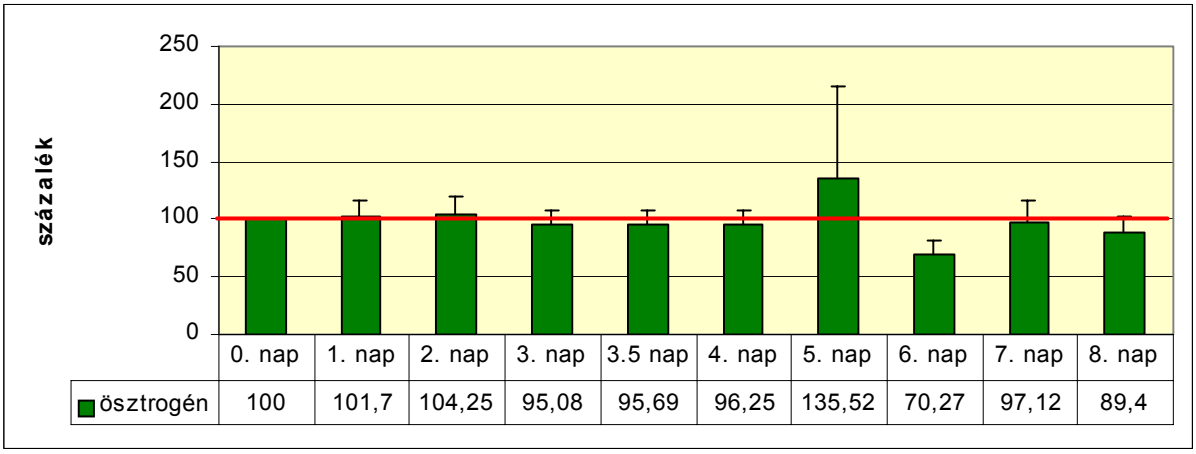
A tojásokból inkubálás előtt vett szikminták szteroid koncentrációit tekintettük száz százaléknak, ehhez viszonyítottuk a keltetés különböző napjain mért százalékosan kifejezett értékeket (24 óránként történt a mintavétel, kivétel a 84. órai mintavétel n=96). Az oszlopdiagramokon csak azokat az embriókat ábrázoltam, melyeket a kísérlet végéig nyomon tudtam követni (n=15).



	0. nap	1. nap	2. nap	3. nap	3.5 nap	4. nap	5. nap	6. nap	7. nap	8. nap
Tesztoszteron	100	88,65	104,11	97,39	102,1	107,6	172,68	95,33	66,17	86,11

7. ábra A tesztoszteron (T) koncentráció változása a keltetés első 8 napjában
A tojásokból inkubálás előtt vett szikminták T koncentrációit tekintettük 100 százaléknak, ehhez viszonyítottuk a keltetés különböző napjain mért százalékosan kifejezett értékeket.

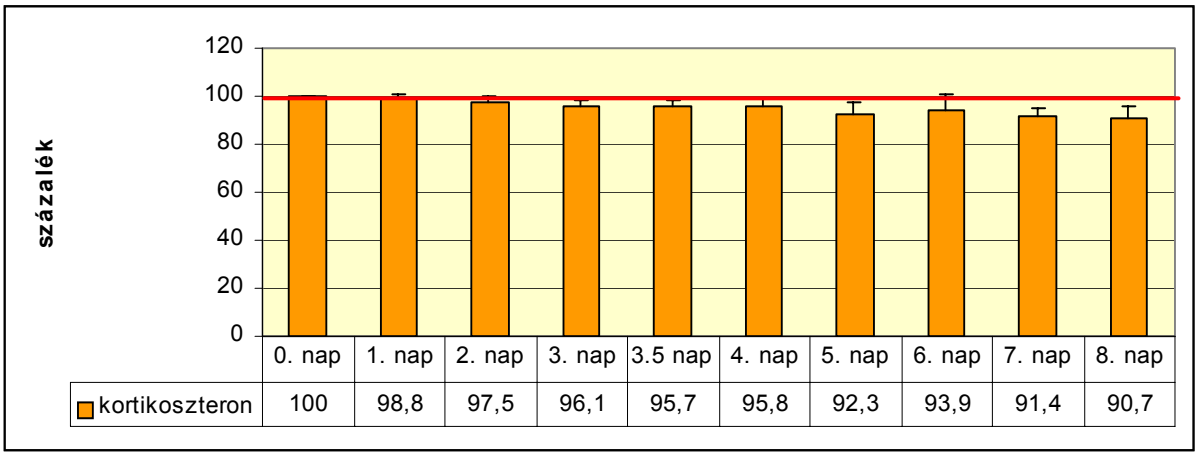
Eredményeink azt mutatják, hogy a keltetés 4. napjáig nem történt jelentős változás a szik T és E2 koncentrációjában, de az 5. napon mindkét szteroid esetében jelentős koncentráció változás volt megfigyelhető (7. *és 8. ábra*). A T esetében ez a nagy szórás abból adódhatott, hogy a nőivarú embriót tartalmazó tojásszikben kisebb mértékű csökkenést tapasztaltunk, míg a hímembriókat tartalmazó tojásokban igen tág intervallumban (113%-289%) történő koncentráció emelkedést detektáltunk. Az E2 is hasonló jelenséget tapasztaltunk, de ebben az esetben a nőivarú embriókban találtuk a magasabb értékeket (122%-229%), míg a hímeknél stagnáló vagy kismértékben csökkenő tendencia volt megfigyelhető.



	0. nap	1. nap	2. nap	3. nap	3.5 nap	4. nap	5. nap	6. nap	7. nap	8. nap
ösztrogén	100	101,7	104,25	95,08	95,69	96,25	135,52	70,27	97,12	89,4

8. ábra Az ösztrogén (E2) koncentráció változása a keltetés első 8 napjában
A tojásokból inkubálás előtt vett szikminták E2 koncentrációit tekintettük 100 százaléknak, ehhez viszonyítottuk a keltetés különböző napjain mért százalékosan kifejezett értékeket.

A szikben mérhető kortikoszteron (9. ábra) folyamatos lassú csökkenést mutat, tehát e szteroid esetében is megfelelő –a maternális allokációra történő dedukció- a 84 órás inkubáció után.



	0. nap	1. nap	2. nap	3. nap	3.5 nap	4. nap	5. nap	6. nap	7. nap	8. nap
kortikoszteron	100	98,8	97,5	96,1	95,7	95,8	92,3	93,9	91,4	90,7

9. ábra A kortikoszteron (B) koncentráció változása a keltetés első 8 napjában
A tojásokból inkubálás előtt vett szikminták B koncentrációit tekintettük 100 százaléknak, ehhez viszonyítottuk a keltetés különböző napjain mért százalékosan kifejezett értékeket.

Összességében megállapítható, hogy az általunk használt 3,5 napig (84 óra) inkubált tojás szteroid koncentrációi még jól tükrözik a tojó által allokált mennyiséget.

4.3. A faeces képződés kinetikája intakt állatokban. A plazma-bélsár fázis eltolódás tesztoszteron terhelés hatására

4.3.1 A takarmány-áthaladás az őszi posztrefrakter - szexuálisan inaktív- időszak alatt

Kísérleteinket két periódusban végeztük: októberben a posztrefrakter időszakban, és májusban a szaporodási ciklusban.

Október végén már kialakult a mindkét ivarra a jellemző nászruha, mely a tavaszi szaporodási időszak végéig marad meg. Ezen időszak alatt az állatok viselkedésére az agresszivitás, a tojók „bókolása", a gácsérok udvarlása jellemző, míg párzás csak ritkán figyelhető meg.

A színezett takarmány azonos mennyiségben történt tömése mindig azonos időben délelőtt kilenc órakor és minden esetben üres emésztőtraktussal történt. A takarmánybevitel után mértük az első színezett bélsár megjelenését és rögzítettük az első már nem színezett faeces megjelenését is. Eredményeink azt mutatják, hogy a színezett takarmány kiürülése hímekben 36 perccel a takarmányfelvétel után, míg tojókban ez átlagosan másfélszer hosszabb idő múlva indult meg (56 perc). Érdekes, hogy a teljes áthaladási időtartam mindkét ivarban azonos volt, így a retenciós időben (az első színezett bélsár és az első már nem jelölt faeces között eltelt idő) is szignifikáns különbséget találtunk az ivarok között, s ez a tojókban bizonyult rövidebbnek.

8. táblázat Takarmány áthaladás vizsgálata a posztrefrakter időszakban
A hímeknél hamarabb jelenik meg az első, színezett bélsár, a retenciós idő hosszabb, a teljes takarmány-áthaladás azonban azonos mindkét ivarban.

	Posztrefrakter periódus		
	Az első színezett faeces megjelenése (perc)	**Teljes áthaladás időtartama (perc)**	**A retenciós idő (perc)**
Hím	35,6±2,70*	253,8±3,03	218,2±3,35*
Tojó	56,0±3,16*	253,6±4,16	197,6±5,68*

*: $p \leq 0,001$ (t-test)

4.3.2 A takarmány- áthaladás a reprodukciós időszakban

A szexuálisan aktív időszakban az első színes bélsár megjelenésének időpontja hímeknél 2,5 x, míg a tojóknál 2x hosszabb idő múlva volt detektálható. Ebben a periódusban is a hímeknél volt gyorsabb az első színezett bélsár megjelenése, itt is átlagosan 20 perc volt a differencia, de jóval nagyobb egyedi különbségek adódtak, mint az aszexuális időszakban. A retenciós idő a tojókban bizonyult szignifikánsan rövidebbnek a posztrefrakter periódushoz hasonlóan.

9. táblázat Takarmány áthaladás vizsgálata a szaporodási időszakban
A hímeknél hamarabb jelenik meg az első, színezett bélsár, a retenciós idő hosszabb, a teljes takarmány-áthaladás azonban azonos mindkét ivarban.

	Reprodukciós időszak		
	Az első színezett faeces megjelenése (perc)	**Teljes áthaladás időtartama (perc)**	**A retenciós idő (perc)**
Hím	92,7±25,82[a]	248,8±17,24	156,0±22,89[b]
Tojó	111,8±18,20[a]	242,6±17,30	130,8±12,76[b]

a: p=0,05 (t-test), b: p=0,01(t-test)

4.3.3 A tesztoszteron terhelés

Az intraperitoniálisan, a fiziológiás szint 100 x tartalmazó T injekció beadása előtt bélsár mintákat gyűjtöttünk kacsáinktól, hiszen az állat kézbevétele az esetek több mint 90%-ban defekációval jár. Ezeket az alap, fiziológiás T értékeket neveztük el Kontroll I. alapadatoknak. A második kontroll értéknek a T terhelést követő 24. órában vett értékeket tekintettük (Kontroll II.).

Az ábrákon (*10-13.*) feltüntettet átlagok legalább a 10-10 állat 5 defekációját jelenti. Néhány esetben a kísérleti egyed 10 percen belül kétszer is defekált, ezeket a mintákat pooloztuk. Illetve az átlaggörbéken a 10 percen belüli mintákat átlagoltuk.

Jelentős különbséget állapítottunk meg a defekáció gyakoriságát illetően. Szignifikáns eltérést tapasztaltunk a szexuálisan inaktív és aktív periódus között, sőt a posztrefrakter időszakban még a két ivar között is. Míg ősszel a hímivarban a defekációs gyakoriság magasabb értéket mutat, mint a tojókban, addig az ivarok közti különbség már nem található meg a reprodukciós ciklusban. Általánosan megállapítható azonban, hogy a szexuálisan inaktív periódusban mind a hímek, mind a tojók gyakrabban defekálnak, mint a szaporodási ciklusukban. Ezen a megállapításoknak a mintavételek tervezésében volt szerepük.

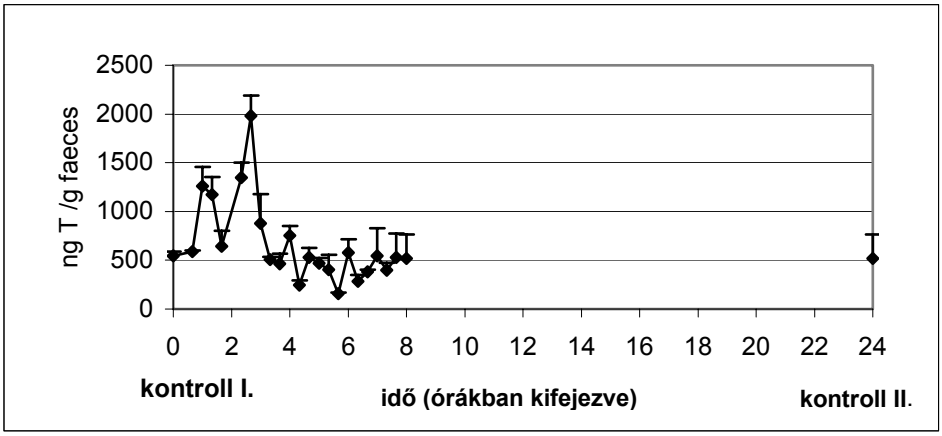
10. táblázat A defekáció gyakorisága a szexuálisan aktív és –inaktív periódusban
A posztrefrakter időszakban mind a hímek, mind a tojók gyakrabban defekálnak, sőt ekkor a gácsérok defekációja gyakoribb, mint a nőivaré.

	Posztrefrakter időszak	**Reprodukciós ciklus**
Hím	16,0±2,72/8 óra [a,b]	9,48±1,48/8 óra [b]
Tojó	13,5±1,20/8 óra [a,c]	11,2±3,11/8 óra [c]

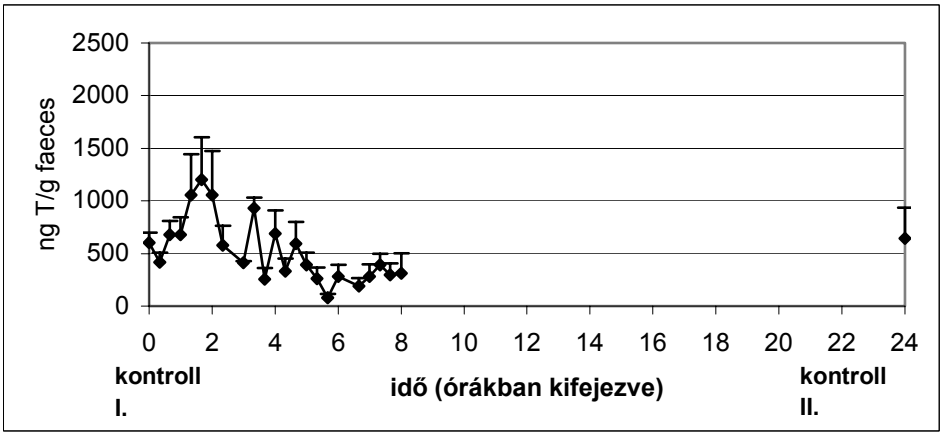
[a, b]: p<0,001
[c]: p<0,05 (t-test)

A posztrefrakter periódusban, a T terhelést követően már 1 óra múlva egy határozott emelkedést tapasztaltunk a fekális T tartalmat tekintve a hímekben (*10. ábra*), míg a tojókban (*11. ábra*) csak egy kisebb koncentrációnövekedést detektáltunk. A megnövekedett tesztoszteron exkréció a terhelést követő 5 órában lecseng mindkét ivarban. A fiziológiás alapértéket tekintve nem találtunk különbséget a tojókat és gácsérokat tekintve, de – a görbe alatti terület kiszámításával- a hímeknél a

T terhelés mintegy 25 %-kal magasabb T ürülést indukált –azaz 25%-kal nagyobb volt a görbe alatti terület-, mint a nőivarban. Megállapítható, hogy a T terhelést követő 5 óra alatt az összes -a 8 óra alatt detektált- T ekvivalensek kb. 77 %-a ürült ki mindkét ivarnál (hímeknél 76,74 %, tojóknál 76,50 %).



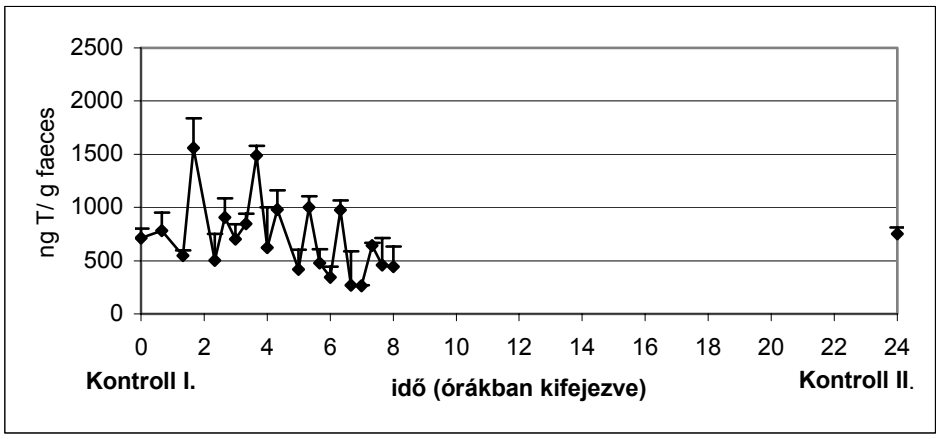
10. ábra A gácsérok fekális T értékei az őszi posztrefrakter periódusban
A T terhelést követően 1 óra múlva tapasztalható az első T csúcs, a terhelést követő 5. órában az összes- a 8 óra alatt detektált- T ekvivelens 76,74%-a ürült ki.



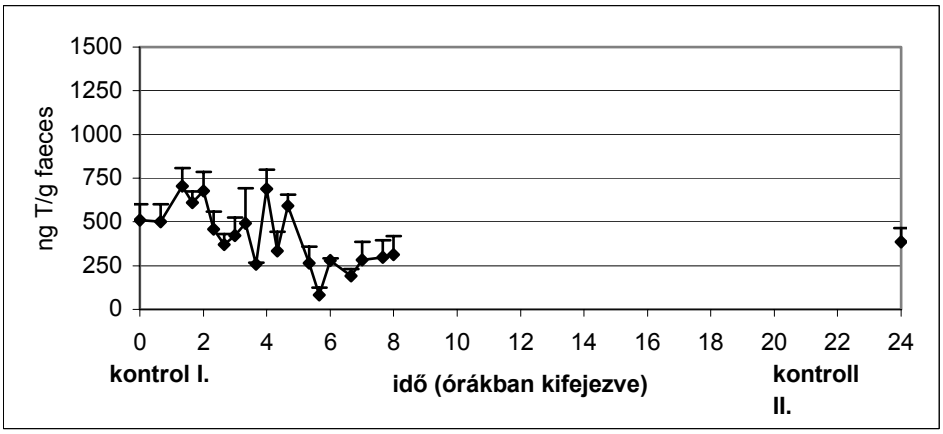
11. ábra A tojók fekális T értékei az őszi posztrefrakter periódusban
A T terhelést követően 1,5 óra múlva tapasztalható az első T csúcs, a terhelést követő 5. órában az összes- a 8 óra alatt detektált- T ekvivelens 76,50%-a ürült ki

Tavasszal *a reprodukciós ciklusban*, a gácsérokban a T terhelést követően, erősen fluktuáló T exkréciót figyeltünk meg. Természetesen –a reprodukciós időszak miatt - a bazális T koncentrációk (kontroll I. értékek) szignifikánsan magasabb értéket mutatnak. Tojóknál, a fiziológiai érték megegyezik az ősszel mért adatokkal. A nőivarban (*13. ábra*) a terhelést követő 1,5-2 óra múlva jelennek meg az első jelentősebb T csúcsértékek, melyek a posztrefrakter periódushoz hasonlóan alacsonyabb tartományban mozognak. Gácséroknál (*12. ábra*), 1,5 óra után jelenik meg az első kiugróan magas érték, a második csúcsérték pedig újabb 2,5 óra múlva (a kiinduláshoz viszonyítva 4 óránál) látható. Hasonlóan a posztrefrakter időszakhoz, itt is 5 óra a terhelésre adott válasz

időtartama. A T terhelést követő 5 óra alatt az összes -a 8 óra alatt detektált- T ekvivalensek kb. 72 %-a ürült ki mindkét ivart tekintve (hímeknél 72,27 %, tojóknál 71,82 %).



12. ábra A gácsérok fekális T értékei a tavaszi reprodukciós ciklusban
A T terhelést követően 1,5-2 óra múlva tapasztalható az első T csúcs, a terhelést követő 5. órában az összes- a 8 óra alatt detektált- T ekvivelens 72,27%-a ürült ki



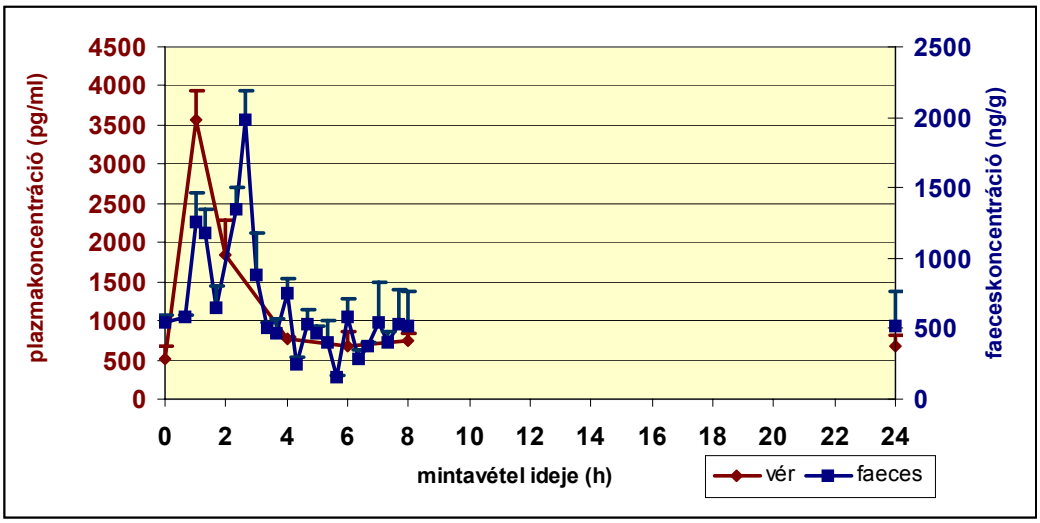
13. ábra A tojók fekális T értékei a tavaszi reprodukciós ciklusban
A T terhelést követően 1,5 óra múlva tapasztalható az első T csúcs, a terhelést követő 5. órában az összes- a 8 óra alatt detektált- T ekvivelens 71,82%-a ürült ki

4.3.4 A vérplazmában mért koncentráció és a bélsárban detektált exkréciós csúcsértékek közötti fázis eltolódás

Az intraperitoneálisan injektált T egy órán belül felszívódott, és ez az érték nyomon követhető a beavatkozást követő 1. órai vérvétel eredményein, ciklustól és ivartól függetlenül, minden esetben ekkor kaptuk a legmagasabb értékeket.

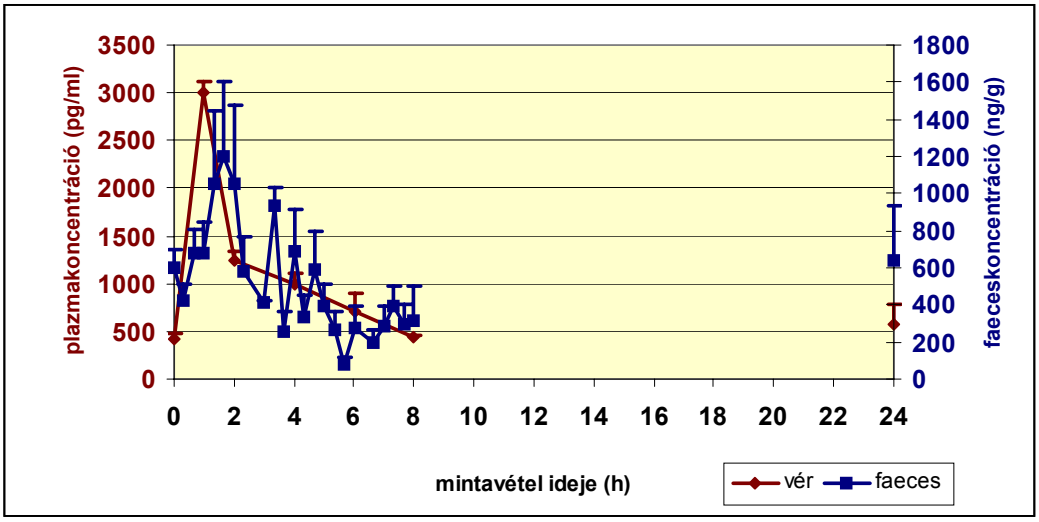
A posztrefrakter időszakban, gácséroknál (*14. ábra*), a plazmában 1 óra múltán mérhető kiugróan magas ($p<0,0001$, t-test) értékkel azonos időben a bélsárban is megjelent egy a kontroll I értékhez viszonyítva szignifikáns ($p<0,0001$) első csúcsérték (1 óra) , majd ezt követő 100 percben (2,66 óra) megjelent egy másik 57 százalékkal magasabb csúcs. Tojóknál (*15. ábra*) is 1 óra múltán

kiugró plazma T csúcsot (p<0,0001) mértünk, a bélsárban viszont az első és a legmagasabb értékeket 1,33 és 2 óra között kaptunk (p<0,001), a második csúcsérték két óra múlva (3,33 órakor; p<0,0001) jelentkezett. Tehát az első csúcsértékek 1-2 óra között, míg a második ürülési hullám 2,66-3,33 óra között realizálódott, azaz a szexuálisan inaktív időszakban nem találtunk jelentős ivari különbséget. Mindkét ivarban az alapadatok (Kontroll I. értékek) is azonosak voltak. A kontroll II. értékek a kezelést követően 24 óra múltán a kiindulási, fiziológiás értéket mutatják.



14 ábra A gácsérok plazma és fekális T értékei az őszi posztrefrakter periódusban i.p. injektált T kezelés után

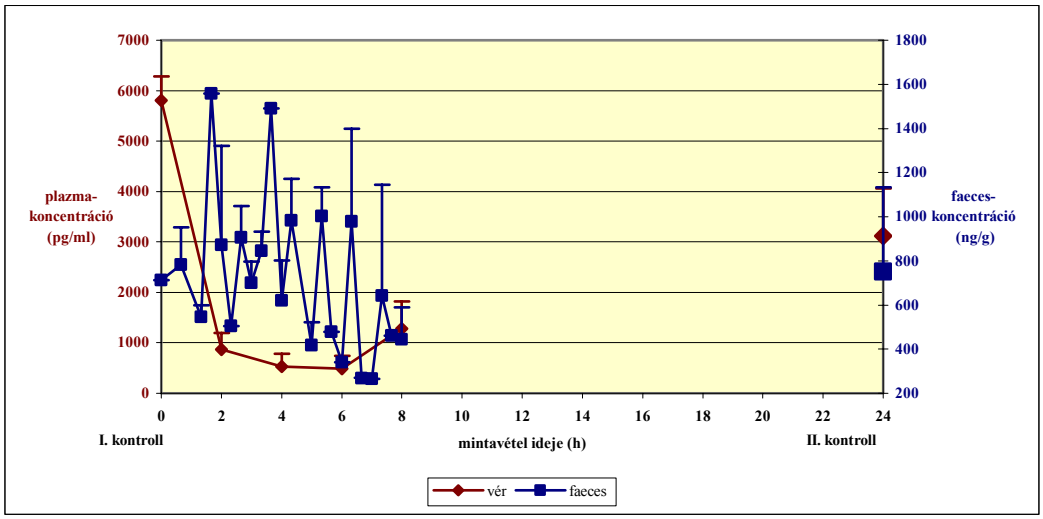
A plazmában a T terhelést követően az 1 órás vérvételnél kiugró T csúcs, amely a 4. órában tér vissza a fiziológiás szintre.



15. ábra A tojók plazma és fekális T értékei az őszi posztrefrakter periódusban i.p. injektált T kezelés után

A plazmában a T terhelést követően az 1 órás vérvételnél kiugró T csúcs, amely a 6. órában tér vissza a fiziológiás szintre.

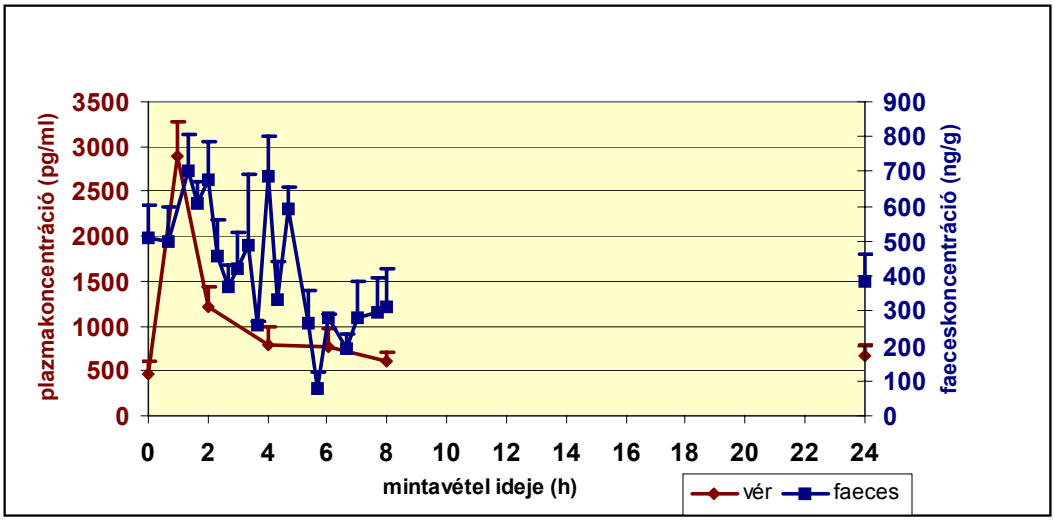
A *szaporodási időszakban* természetesen a *gácsérokban* (*16. ábra*) a tesztoszteron koncentrációk szignifikánsan magasabb értéket mutatnak, mind a tojókhoz (*17. ábra*), mind pedig a posztrefrakter periódushoz viszonyítva (mindkét esetben p<0,0001, t-test). 1 óra múlva viszont nem találtunk statisztikailag igazolható koncentráció emelkedést. Sőt a két órás vérvételnél egy erőteljes T szint csökkenést rögzítettünk (p<0,0001), amely a 6 órás vérvételnél éri el a minimumát (374,69±77,25 pg/ml, 4 és 6 órai érték között p<0,05), majd fokozatosan emelkedni kezd, emellett a kontroll II. értéknél is csak a 24 órával ezelőtti érték 41 százalékát detektáltuk. A faecesben terhelést követő 100 percnél (1,66 óra) rögzítettük az első T csúcsot (p<0,0001), a másodikat pedig 220 percnél (3,66 óra, p<0,0001).



16. ábra A gácsérok plazma és fekális T értékei a tavaszi szaporodási ciklusban i.p. injektált T kezelés után

A T koncentrációk esetében 1 óra múlva nincs statisztikailag igazolható emelkedés, a 2 órás vérvételnél egy erőteljes T szint csökkenés, amely a 6 óránál éri el a minimumát a kontroll II. értéknél sem éri el a kiindulási szintet.

Tojóknál (*17. ábra*), a plazma T tartalma az elvártnak megfelelően megegyezett az ősszel mért koncentrációkkal, és hasonlóan a posztrefrakter időszakban tapasztaltakkal, 1 óra múlva figyeltük meg a csúcsértéket. Az első csúcsértékek a bélsárban a szexuálisan inaktív időszakkal megegyezően percre pontosan 80 perc és 120 perc múlva (1,33 és 2 óra, $p<0,05$) jelentek meg, míg a második hullám –a posztrefrakter periódushoz képest- mintegy 40 perccel később, a 4. órában jelentkezett ($p<0,001$). Tehát az első csúcsértékek 1,33-2 óra között, míg a második ürülési hullám 3,66-4 óra között realizálódott, azaz itt sem találtunk jelentős ivari különbséget. Az ősszel mért értékekhez képest a második csúcs azonban 1 órával eltolódott. A kontroll II. plazmaértékek megegyeznek a kiindulási értékekkel.



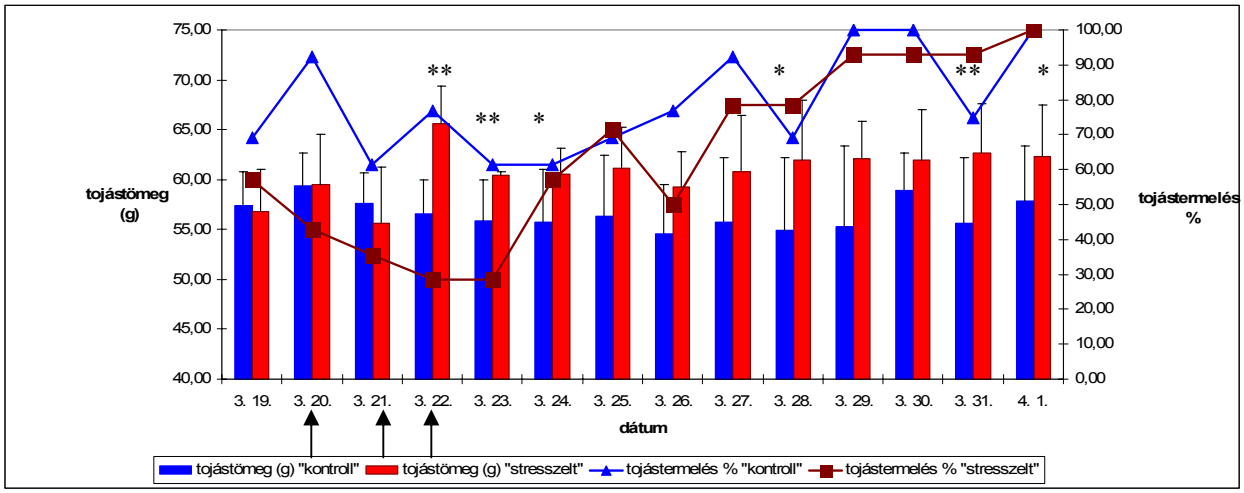
17. ábra A tojók plazma és fekális T értékei a tavaszi szaporodási ciklusban i.p. injektált T kezelés után

A plazmában – az őszi, posztrefrakter időszakkal megegyezően- a T terhelést követően az 1 órás vérvételnél kiugró T csúcs, amely a 6. órában tér vissza a fiziológiás szintre.

4.4. Maternális stressz vizsgálatok

4.4.1. Handling stressz vizsgálatok az első évben, nagyszülő generáció

A két handling-stressz kezelést követően a stresszelt („2.”) csoportban a tojástermelés rövid idejű visszaesését figyelhetjük meg különösen az első kezelést követő 4-5. napon, ezzel párhuzamosan emelkedik a tojástömeg: átlagban mintegy 7 %-al, (*18. ábra*) és ez a megnövekedett tömeg a vizsgált periódusban mindvégig megfigyelhető volt. A nagyobb tömegű tojásokból a kikelő utódok száma csökkent (*11. táblázat*).



18. ábra A handling stressz hatására a tojástermelés és tojástömeg változásai a két csoportban
(↑: **handling-stressz kezelések, ANOVA**:*:p<0,05 **:p<0,001)
A stresszelt csoportban rövididejű tojástermelés csökkenés és ezzel párhuzamosan tojásméret növekedés figyelhető meg.

A stresszelt csoport kelési százaléka mintegy 20%-kal elmaradt a kontrollhoz képest és ez a különbség jórészt a korai embrió elhalásból adódott (11. *táblázat*). Háromszorosára emelkedett az embrióelhalás (korai elhalás a keltetés 3-10. napján), a második elhalási csúcsot pedig a 21. nap körül kaptuk, de itt már kisebb a különbség a kontrollhoz képest. A befulladás mértéke mindkét csoportban azonosan alakult. A kezelt csoportban a fiókák tömeges kelése mintegy 12-24 órával megelőzte a kontroll csoportot.

11. táblázat A kelés alakulása a két csoportban
A stresszelt csoportban 23%-kal csökkent a kelési%, amely főként a korai embrióelhalásból (I. lámpázási eredmények) adódott.

	Handling stressz	
	kontroll n=108	*stresszelt n=89*
I. lámpázáskor kiesett (10. nap) %	7,51	25,82
II. lámpázáskor kiesett (25.nap) %	5,23	8,73
Befulladás %	4,12	5,34
Kelési %	**83,14**	**60,11**

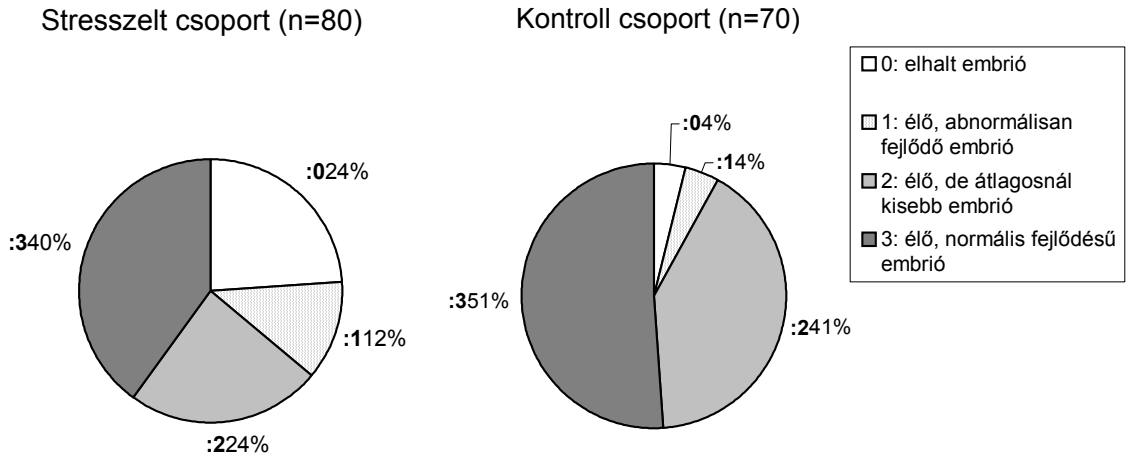
Az életképes naposkacsák testtömege azonos volt a kontroll és a stresszelt csoportban, de egyhetes korban a kezelt csoport utódai szignifikánsan kisebbek voltak, mint a kontroll utódok (12. *táblázat*). Ez a hátrányuk csak a juvenilis vedlés kezdetéig maradt meg, ugyanis a kezelt csoport utódai gyorsabban és többnyire egyszerre fejezték be a vedlésüket és így a 12. élethéten már utolérték, sőt a gácsérok el is hagyták a kontroll csoportba tartozó társaikat a testtömeg tekintetében. A vedlés során bekövetkező testtömeg-csökkenés a kontroll csoportban kifejezettebb volt.

12. táblázat Az utódok testtömegének alakulása a handling stresszt követően
Az első élethéten a stresszelt csoport utódainak testtömege elmarad a kontrollhoz képest, a 4. hétre kiegyenlítődik a különbség, a juvenilis vedlés befejeződését követően a stresszelt csoport hímivarú utódai magasabb testtömeget mutatnak.

	napos	1 hetes	4 hetes	8 hetes	12 hetes	
					♀	♂
A maternális *handling stresszt* követő F1 testtömeg alakulása (gramm)	33,19 ±4,50	120,5 [a] ±16,9	614,7 ±98,8	1031,3 ±197,8	895,0 ±220,1	1121,8 [b] ±135,1
Kontroll csoport *(gramm)*	32,79 ±4,26	130,4 [a] ±14,8	646,7 ±74,3	1092,5 ±144,6	874,1 ±195,4	1033,3 [b] ±184,0

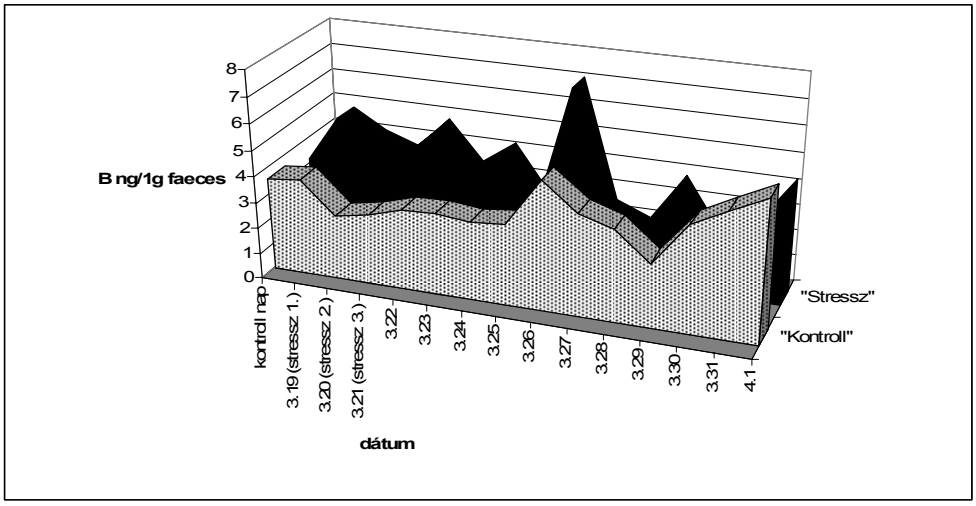
ANOVA: [a, b]: $p<0,05$

A kontroll csoport utódai (n=105) között 45% gácsér: 55 % tojó, míg a handling csoportban ez az arány: 61% gácsér: 39% tojó volt (n=92). Ez az érték szekunder (a kikelt fiókák) ivararányát jelenti. A szikanalízis vizsgálatokban a 84 óra hosszat inkubált tojásokban is megfigyelhető az előbb említett tendencia, mely szerint a kezelt csoportban megnőtt az elhalt és az abnormális embriók aránya (*19. ábra).*



19. ábra Az embriók státusza 84 óra inkubálás után
*A handling stressz hatására hatszorosára emelkedett az elhalt (**0**) embriók, illetve háromszorosára nőtt az élő, de abnormálisan fejlődő (**1**) embriók aránya.*

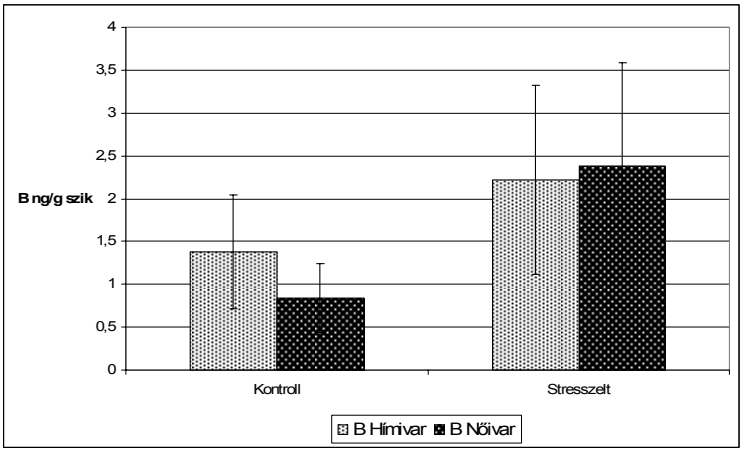
A handling kezelés után a tojóknál megnőtt a bélsárban mérhető *kortikoszteron* koncentráció (*20. ábra*), statisztikailag (a görbe alatti területszámítással) 25 %-kal magasabb ez az érték, ha a teljes vizsgálati periódust nézzük.



20. ábra A tojók fekális kortikoszteron koncentráció változásai a stresszkezelés alatt és azt követően

Handling kezelés hatására 24,96%-kal nőtt a bélsárból kimutatható B ekvivalens mennyisége.

Ezzel párhuzamosan a tojásszikben is detektálható egy erőteljes szignifikáns emelkedés mind a nőivarú-, mind a hímivarú embriót tartalmazó tojások szikanyagában (*21. ábra*).

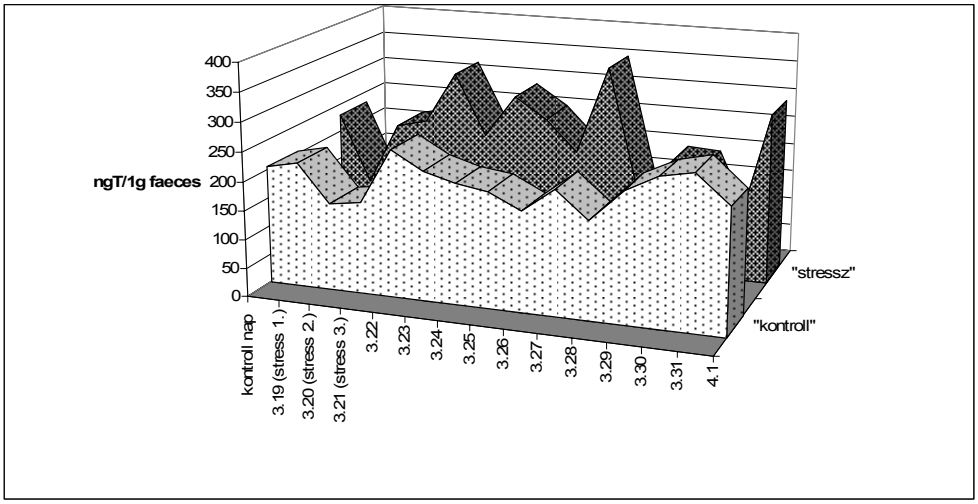


21. ábra A 84. óráig inkubált tojás szik-kortikoszteron (B) koncentrációi a két csoportban

Handling stressz hatására nő a szik B tartalma mind a hím- (t-test, p=0,015) mind a nőivarú (t-test, p=0,0001) embriót tartalmazó tojásokban is. A kontroll csoportnál a hímivarú embriót tartalmazó tojásoknál magasabb értékeket mértünk (t-test, p=0,01).

Ivari különbséget figyelhetünk meg a kontroll csoport tojásaiban, ugyanis a hímivarú embriót tartalmazó tojások szikanyagában magasabb kortikoszteron mennyiséget mértünk.

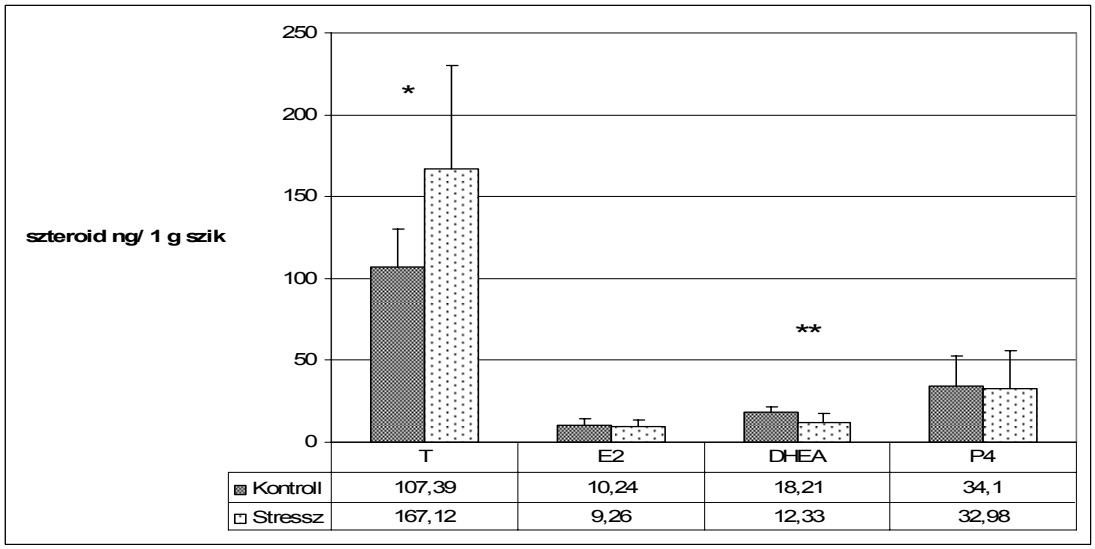
A kezelést követően a tojók bélsár mintáiban 16,69%-kal magasabb *tesztoszteron* koncentráció mérhető a vizsgálat 10. napjáig, majd a különbség eltűnik (*22. ábra*).



22.ábra A tojók fekális tesztoszteron (T) koncentráció változásai a stresszkezelés alatt és azt követően

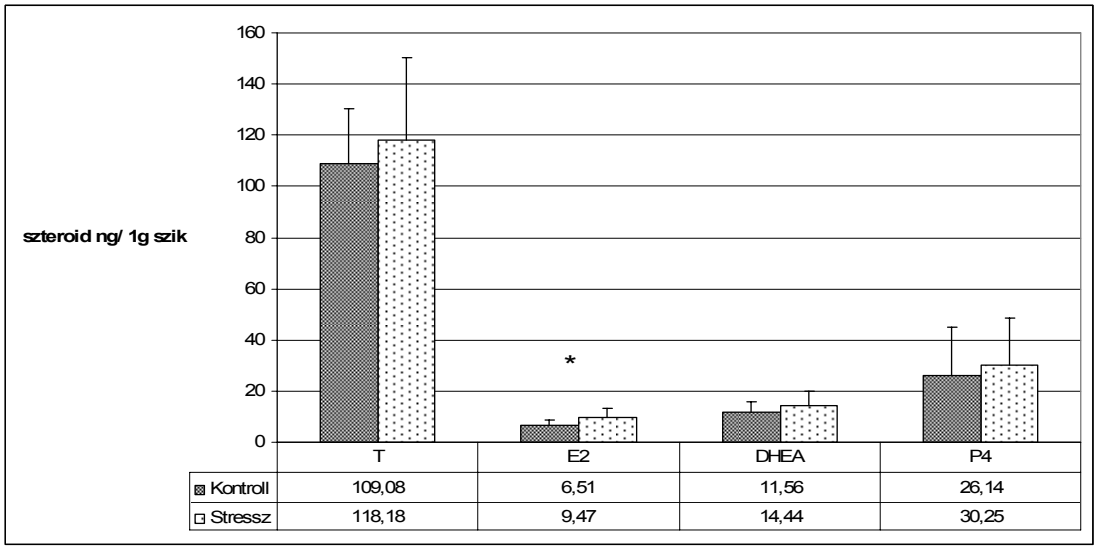
Handling stressz hatására a teljes T produkció 16,69%-kal magasabb értéket mutat.

A tesztoszteron szint emelkedését csak a hímivarú embriót tartalmazó tojásszikben tudtuk kimutatni (*23. ábra*), míg a nőivarú embriót tartalmazó tojásoknál (*24. ábra*) a T koncentráció nem változott a kezelés hatására.



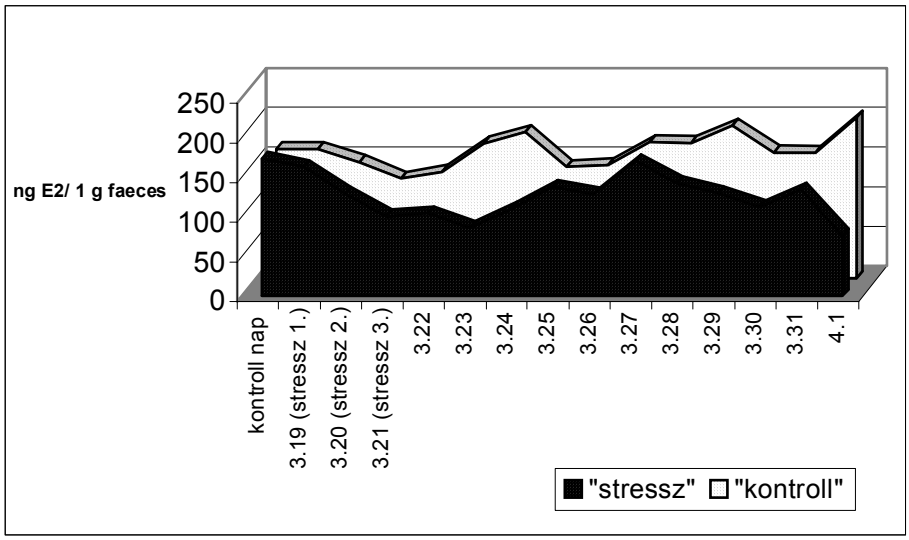
23. ábra A szexuálszteroid koncentrációk a hímivarú embriót tartalmazó tojások szikanyagában

*Handling stressz hatására nőtt a szik **T** tartalma (p=0.03; ANOVA, F:4,10), míg a **DHEA** tartalom csökkent (p=0.01; ANOVA, F:6,71)*



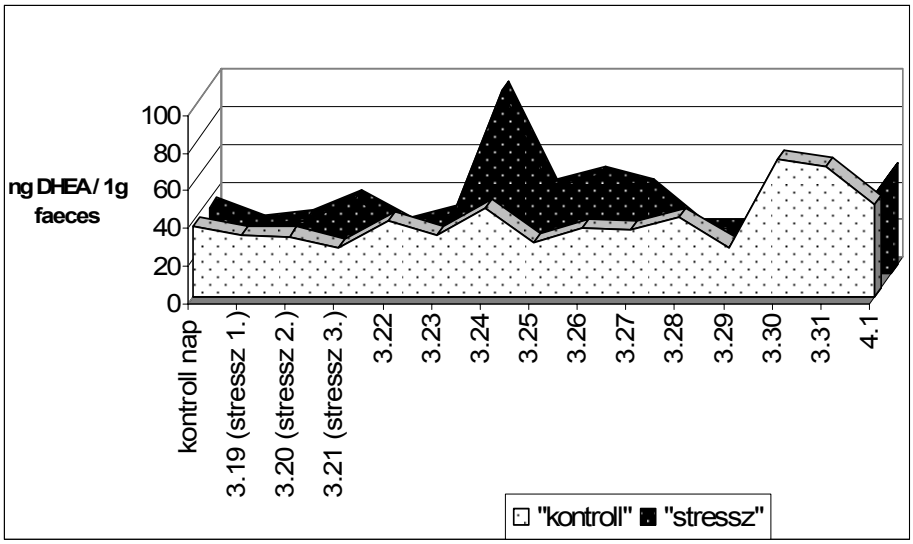
24. ábra A szexuálszteroid koncentrációk a nőivarú embriót tartalmazó tojások szikanyagában
*Handling stressz hatására nőtt a szik **E2** tartalma (p=0.02; ANOVA, F:5,69)*

A stressz csoportban a fiókák tömeges kelése mintegy 12-24 órával megelőzte a kontroll csoportot. A fekális *E2 koncentráció* a stressz csoportban mindvégig elmaradt a kontrollhoz képest (*25.ábra*), 26%-kal csökkent a szumma E2-produkció, annak ellenére, hogy csak a kezelést követően 2-3 napig észleltünk visszaesést a tojástermelésben. A szikben mérhető ösztrogén tartalom a hím embriót tartalmazó tojásokban (*23. ábra*) megegyezett, míg a nőivarúaknál (*24. ábra*) a kezelt csoportban mutat szignifikánsan magasabb értéket.



25.ábra A tojók fekális ösztrogén (E2) koncentráció változásai a stresszkezelés alatt és azt követően
A handling stressz hatására 26%-kal csökkent a bélsárból kimutatható E2 ekvivalens mennyisége.

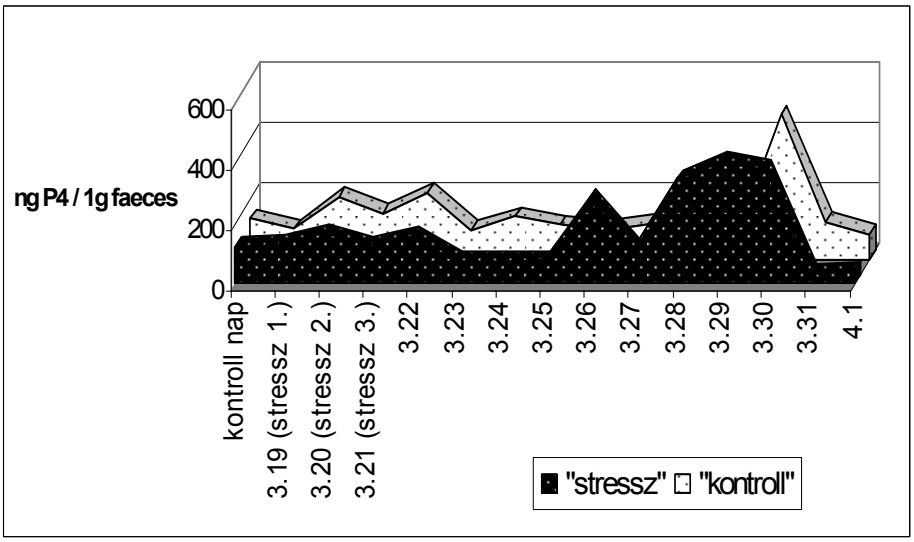
A fekális *DHEA szintek* azonosan alakultak a kísérlet alatt (*26. ábra*), a handling csoportban a kezelés-sorozatot követő 2 napon találunk egy kiugró csúcsértéket, a teljes produkciót tekintve 2,81 %-os csökkenést kaptunk. A szikbe deponált DHEA koncentráció a hímivarnál (*23. ábra*) szignifikánsan alacsonyabb volt a kezelés hatására, nőivarnál (*24. ábra*) ez a szint azonosan alakult a két csoportban.



26. ábra A tojók fekális dehidro-epiandroszteron (DHEA) koncentráció változásai a stresszkezelés alatt és azt követően

A handling stressz hatására a kezelés sorozatot követően a 2. napon egy kiugró magas értéket mutat, azonban a teljes produkciót tekintve a csoportok megegyeztek (-2,31% a stressz csoportban).

A *fekális P4 értékek* a kezelést követő 9. napig elmaradnak a kontrollhoz képest, majd egy erőteljes szignifikáns növekedés látható, amely összefüggésben állhat a következő F1 tüsző nemzedékkel, ha total P4 produkciót tekintjük, akkor 12,30 %-os a növekedés a kezelés hatására (*27. ábra*). A szikben nem található különbség (*23. és 24. ábra*).



27. ábra A tojók fekális progeszteron (P4) koncentráció változásai a stressz alkalmazása alatt- és azt követően

A stresszkezelés hatására a teljes P4 produkciót tekintve 12,30%-os növekedés volt kimutatható.

Összegezve, handling csoport hímivarú embrióinál a T, míg a nőivarnál az E2 emelkedett meg szignifikánsan a stressz hatására. A DHEA koncentráció elmarad a kezelt csoport hímivarú embrióit tartalmazó tojásoknál.

A stresszkezelés része volt a tojóktól való vérvétel is, a plazma-mintákat analizáltuk, az alábbi (13.) táblázatban láthatóak ezen eredmények.

13. táblázat A stresszelt tojók vérplazma szteroid koncentrációk (pg/ml) eredményei a handling kezelés részeként
Statisztikailag igazolható különbség csak a B esetében a kezelés első és második napja között mutatható ki.

	1. nap		**2. nap**		**3. nap**
T (pg/ml)	107,27±96,69	NS	112,49±85,54	NS	84,95±57,93
E2 (pg/ml)	118,50±95,39	NS	112,49±86,54	NS	84,96±57,33
P4 (pg/ml)	97,67±59,92	NS	105,78±58,36	NS	104,87±76,26
B (pg/ml)	96,96±47,52	< p=0,02	200,24±143,45	NS	213,46±137,15

A vérből történő analízis egyik hátránya, hogy pillanatnyi fiziológiai állapotot tükröz, nagyon nagy az egyedi különbség, ezért igen magas szórásértékeket kaptunk. A másik hátrány a biológiai minta mennyisége, a levett vérmennyiség nem lett elég az 5 hormon analíziseire, ráadásul ismételni sem lehetett. Az extraktumokból a 3 szexuálszteroidon kívül még az extrakciós recovery meghatározásához is 25 µl mennyiségre szükség volt. A szexuálszteroidokat tekintve nem találtunk szignifikáns különbséget a napok között. A kortikoszteron esetében már a 2. napon szignifikáns emelkedést detektáltunk az igen magas szórás ellenére is.
A további kísérleteinkben, bár a plazma minták rendelkezésünkre álltak, nem határoztuk meg őket.

A *kikelt utódokat* „kloáka kifordítós” ún. japán módszerrel szexáltuk, fejlődésüket nyomon követtük, egyedileg azonosítottuk és 5 alkalommal mértük a testtömegüket (ld korábban *12. táblázat*). A felnevelés során csak 3 állatot veszítettünk, a stressz csoportban két kiskacsa hullott el (1 db tojó és 1 db gácsér), a kontroll csoportban pedig egy tojó hullott el. Nyolc hetes korban, a juvenilis vedlést megelőzően a szárnyvénából vért vettünk minden egyes kiskacsától, és a plazmából meghatároztuk a 4 szexuálszteroidot ill. a kortikoszteront (*14. 15. 16. 17. 18 táblázatok*).

A következő öt összefoglaló táblázat bemutatja a tojókban mérhető szteroid koncentrációváltozásokat, majd ezt követően a tojásszikben detektálható hormonmennyiségeket, végül a kikelt utódok plazma szteroid szintjeit.

14. táblázat Handling stressz-terhelés és kortikoszteron interakciója

	Kezelt csoport			Kontroll csoport		
	Tojóknál: megemelkedett fekális koncentráció (+25%)					
Tojásszik ng/g	♀ embriót tartalmazó		♂ embriót tartalmazó	♀ embriót tartalmazó		♂ embriót tartalmazó
	2,38±1,28 ng/g	= NS	2,22±1,10 ng/g	0,84±0,40 ng/g	< p=0,01	1,38±0,67 ng/g
		p=0,0001			p=0,015	
8 hetes utód vérplazma ng/ml	♀ utód		♂ utód	♀ utód		♂ utód
	0,93±0,41 ng/ml	< p=0,01	1,46±0,65 ng/ml	0,90±0,41 ng/ml	< p=0,02	1,31±0,57 ng/ml

A *kortikoszteron és stressz-terhelés interakciója* összefoglaló táblázat (*14.*) ismerteti, hogy a tojók faecesében mérhető B koncentráció emelkedés megjelenik a tojásszikben is, emellett mind a nőivarú-, mind a hímivarú embriókat tartalmazó tojásokban is szignifikáns emelkedést tapasztaltunk. A 8 hetes utódoknál a csoportok közt nem volt statisztikailag értékelhető különbség, azonban mindkét csoport hímivarú utódainál –a nőivarúakhoz képest- szignifikáns emelkedést tudtunk igazolni.

15. táblázat Handling stressz-terhelés és tesztoszteron interakciója

	Kezelt csoport			Kontroll csoport		
	Tojóknál: megemelkedett fekális koncentráció (+17%)					
Tojásszik ng/g (84 h)	♀ embriót tartalmazó		♂ embriót tartalmazó	♀ embriót tartalmazó		♂ embriót tartalmazó
	116,1±31,17 ng/g	< p=0,046	167,0±46,4 ng/g	109,1±21,52 ng/g	= NS	107,4±23,59 ng/g
				p=0,023		
8 hetes utód vérplazma ng/ml	♀ utód		♂ utód	♀ utód		♂ utód
	0,41±0,27 ng/ml	< p=0,01	0,55±0,30 ng/ml	0,23±0,12 ng/ml	= NS	0,23±0,15 ng/ml
	p=0,017			p=0,003		

A *tesztoszteron és stressz-terhelés interakciója 15.* összefoglaló táblázat ismerteti, hogy a tojók faecesében mérhető T koncentrációemelkedés megjelenik a szikbe deponált szteroidok koncentrációjában is. Bár itt csak a hímivarú embriót tartalmazó tojás szikanyagában tudtunk statisztikailag is igazolható különbséget kimutatni. A 8 hetes utódok vérplazmájában a kezelt csoport utódainál jelentős szignifikáns emelkedést igazoltunk –a kontroll csoporthoz képest- mindkét ivart tekintve, sőt a kezelt csoport utódainál ivari különbséget is detektáltunk, azaz a hímeknél mindig magasabb T érték volt mérhető.

16. táblázat Handling stressz-terhelés és dehidro-epiandroszteron interakciója

	Kezelt csoport			Kontroll csoport		
	Tojóknál: megegyező fekális koncentráció (-0,8%)					
Tojásszik ng/g (84 h)	♀ embriót tartalmazó		♂ embriót tartalmazó	♀ embriót tartalmazó		♂ embriót tartalmazó
	14,44±5,7 ng/g	= NS	12,33±5,4 ng/g	11,56±4,3 ng/g	< p=0,0003	18,21±3,0 ng/g
					p=0,03	
8 hetes utód vérplazma ng/ml	♀ utód		♂ utód	♀ utód		♂ utód
	0,23±0,08 ng/ml	< p=0,01	0,47±0,21 ng/ml	0,24±0,04 ng/ml	= NS	0,20±0,05 ng/ml
					p=0,005	

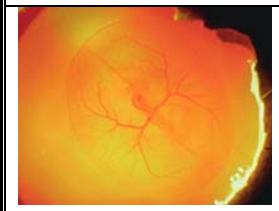
A másik androgénnél, a *DHEA* esetében (*16. táblázat*) a tojók faecesében egy rövid két napig tartó koncentráció emelkedést tapasztaltunk. A szikben a kontroll csoportot tekintve ivari különbség fedezhető fel, azaz a hímembriókat tartalmazó tojásokban szignifikánsan magasabb e szteroid szint. A kezelés hatására ez az ivari különbség eltűnt. A juvenilis állatoknál a kontroll csoportban nem tudtunk ivari különbséget kimutatni, a kezelt csoportban pedig fordítva a hím utódokban volt közel kétszer annyi mennyiségű szteroid mennyiség.

17. táblázat Handling stressz-terhelés és 17-β-ösztradiol interakciója

	Kezelt csoport			Kontroll csoport		
	Tojóknál: csökkent fekális koncentráció (-26%)					
Tojásszik ng/g (84 h)	♀ embriót tartalmazó		♂ embriót tartalmazó	♀ embriót tartalmazó		♂ embriót tartalmazó
	9,47±3,83 ng/g	= NS	9,26±4,26 ng/g	6,51±2,08 ng/g	< p<0,01	10,21±4,13 ng/g
	p=0,02					
8 hetes utód vérplazma ng/ml	♀ utód		♂ utód	♀ utód		♂ utód
	0,58±0,14 ng/ml	> p<0,01	0,15±0,04 ng/ml	0,46±0,08 ng/ml	> p<0,01	0,20±0,04 ng/ml
	p=0,007				p=0,05	

A 17-β-ösztradiol esetében (*17. táblázat*) a tojók faecesében a stressz hatására csökkent a mennyisége, melyet az alacsonyabb tojásprodukció is jelez. A szikben meglepő módon a kontroll csoportban a hímivarú embriót tartalmazó tojásokban szignifikánsan magasabb E2 szintet mértünk. A kezelés hatására viszont a két ivar közti hormonkoncentráció kiegyenlítődött, azaz nem volt különbség. Így a kezelt csoport nőivarú embriót tartalmazó tojásszik E2 tartalma szignifikánsan emelkedett a kontroll nőivarú embriót tartalmazó tojásokhoz képest. A juvenilis állatokban - mindkét csoportban - a nőivarú utódokban mértünk magasabb E2 szintet, a csoportok közti különbségek megmaradtak: a kezelt csoport nőivarú utódainál szignifikánsan magasabb E2 értékeket detektáltunk. A fiatal gácséroknál a kezelés hatására szignifikánsan alacsonyabb E2 koncentrációt kaptunk, mint kontroll társaiknál.

18. táblázat Handling stressz-terhelés és progeszteron interakciója

	Kezelt csoport			**Kontroll csoport**		
	Tojóknál: csökkent fekális koncentráció a kísérlet 9. napjáig, majd erőteljes szignifikáns növekedés (+12 %)					
Tojásszik ng/g (84 h)	♀ embriót tartalmazó		♂ embriót tartalmazó	♀ embriót tartalmazó		♂ embriót tartalmazó
	30,25±18,39 ng/g	= NS	32,98±23,7 ng/g	26,14±18,84 ng/g	= NS	34,10±19,61 ng/g
8 hetes utód vérplazma ng/ml	♀ utód		♂ utód	♀ utód		♂ utód
	0,16±0,03 ng/ml	= NS	0,15±0,04 ng/ml	0,14±0,04 ng/ml	= NS	0,16±0,06 ng/ml

A *progeszteron* (*18. táblázat*) esetében a kísérlet 9. napjáig egy alacsonyabb P4 szint jellemző, majd a kísérlet második felében egy erőteljes koncentráció emelkedés tapasztalható. A tojásszikben mért értékek hasonlóan alakulnak, sem a csoportok közt, sem a két ivar közt nem tudtunk különbséget kimutatni. A juvenilis madarakban: mindkét csoport mindkét ivarában megegyeztek a hormonszintek.

Összefoglalva: a handling stressz hatása *a hímivarú embriót* tartalmazó tojásokban:

-Kortikoszteron koncentráció emelkedés (↑)

-Tesztoszteron koncentráció emelkedés (↑)

-DHEA koncentráció csökkenés (↓)

A handling stressz hatása *a nőivarú embriót* tartalmazó tojásokban:

- Kortikoszteron koncentráció emelkedés (↑)

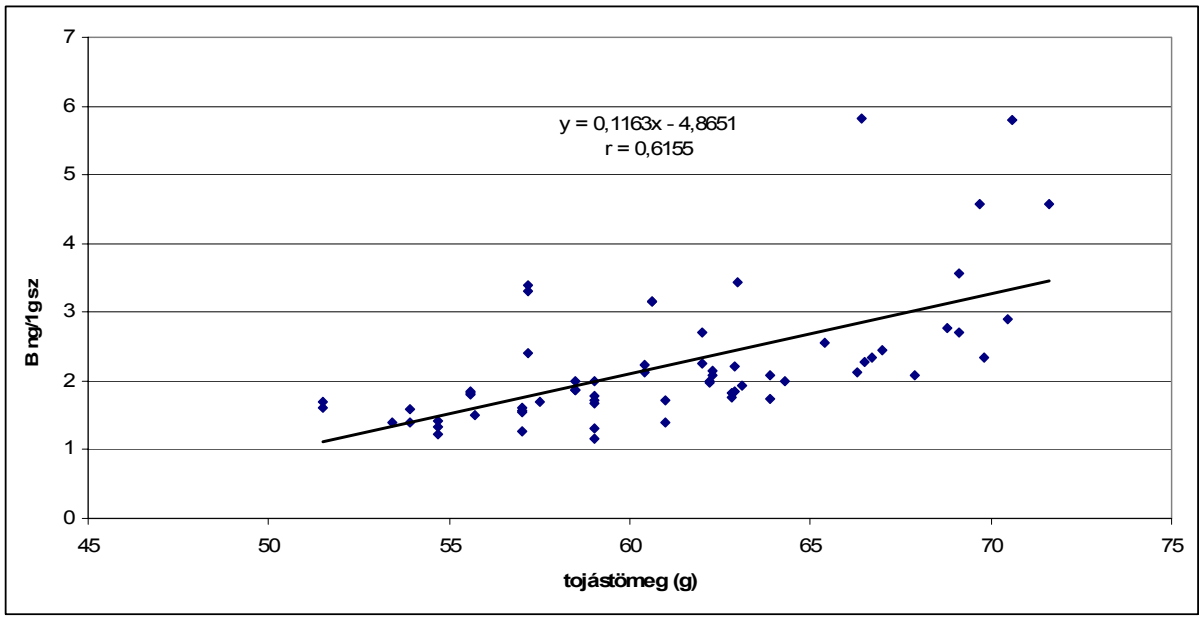
-E2 koncentráció emelkedés (↑)

Az adatainkat tovább boncolgatva, figyelemre méltó összefüggést találtunk az embriófejlettség és B koncentráció, valamint a tojástömeg között.

19. táblázat Az embrióstátusz a kortikoszteron koncentráció és a tojástömeg összefüggései
Az elhalt embriót tartalmazó tojásokban kezeléstől függetlenül magas kortikoszteron koncentráció mérhető, amely magas tojástömeggel párosul. Az élő, normál fejlődésű embriót tartalmazó tojásoknál szintén nem található statisztikai különbség: sem a B koncentrációkban sem pedig a tojástömegben.

		0: elhalt embrió	1: abnormális embrió	2: élő, de átlagnál kisebb	3: élő, normál embrió
B konc ng/g	kontroll	2,53±0,14	1,10±0,15	0,88±0,46	1,16±0,48
	Szignifikancia *(t-test)*	NS	p<0,05	p<0.01	NS
	kezelt	2,77±1,24	2,53±1,21	2,63±1,14	1,54±0,75
Tojástömeg (g)	kontroll	62,15±5,05	62,66±7,30	50,90±7,35	55,56±4,20
	Szignifikancia *(t-test)*	NS	NS	p<0.01	NS
	kezelt	61,96±3,46	64,51±5,56	64,88±5,30	57,05±5,95

A fenti (*19.*) táblázatból kitűnik, hogy az elhalt embriót tartalmazó tojásszikből mindkét csoportban magas glükokortikoid tartalom volt kimutatható. A magas koncentráció mind a kontroll, mind a kezelt csoport tojásainál tömeg-növekedéssel párosult. Az abnormális embriókat tartalmazó tojások esetében a kontroll csoportban alacsony, míg a kezelt csoportban statisztikailag igazolható magas B értékeket kaptunk. Az élő, de kisebb embriókat tartalmazó tojásoknál a kezelés hatására szignifikánsan magasabb B koncentrációk mérhetők, ami a nagyobb tojásmérettel járt együtt. Az élő, normál embriót tartalmazó tojások mindkét paraméterben megegyeztek.

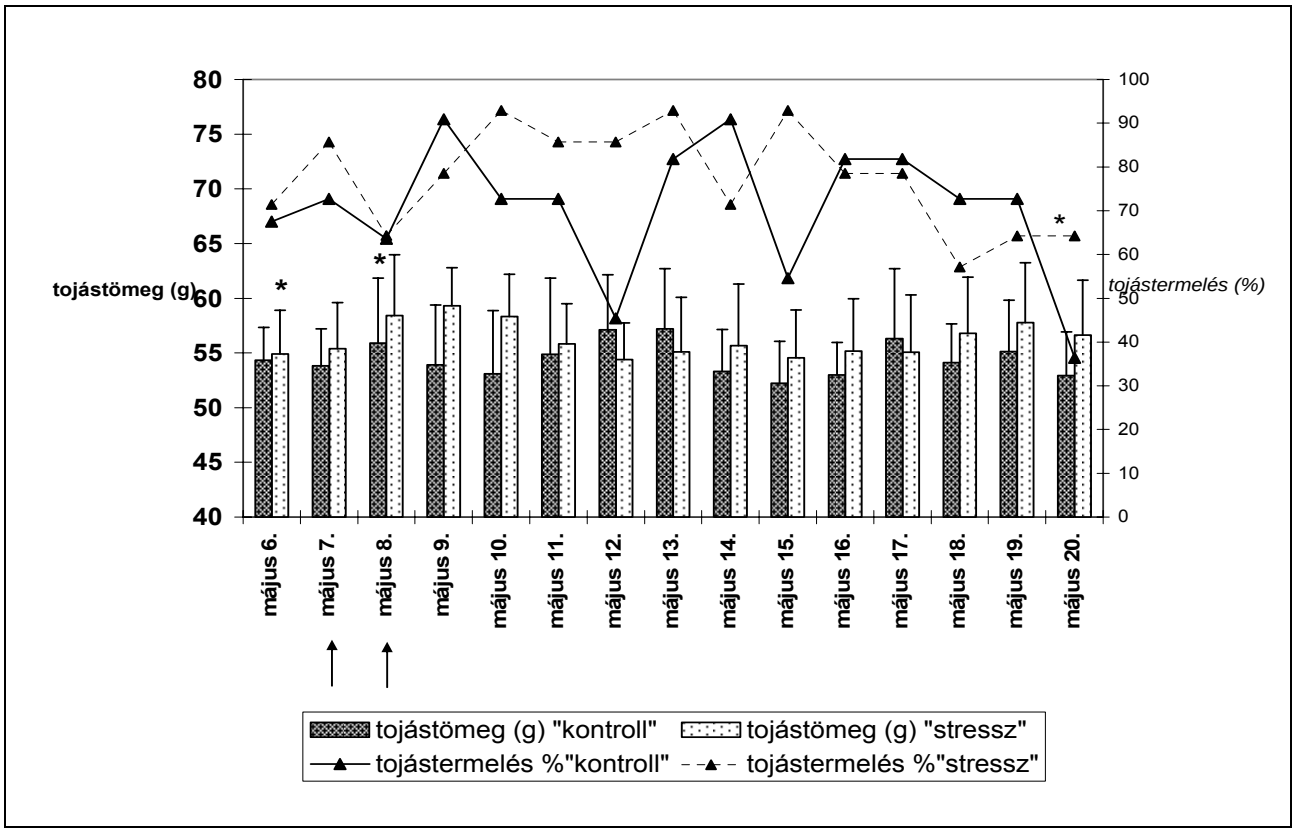


28. ábra A kezelt csoport tojástömeg és szik-kortikoszteron szint összefüggései
A tojástömeg növekedésével párhuzamosan nőtt a szik kortikoszteron tartalma.

A megnövekedett tojástömeg és a B koncentráció között (28. ábra) közepes pozitív korrelációt találtunk (r=+0,6155).

4.4.2. Éter-stressz vizsgálatok az első évben, nagyszülő állomány

A tojók éter-inhalációját követően is megfigyelhető volt egy kezdeti kismértékű tojásprodukció csökkenés, amelyet egy rövididejű (a 2.-3. napon) tojástömeg emelkedés követett (*29. ábra*).



29. ábra Az éter-stressz hatására a tojástermelés és tojástömeg alakulása a két csoportban
(**↑: éter- stressz kezelések, ANOVA**:*:p<0,05)
A stresszelt csoportban rövididejű tojástermelés csökkenés és ezzel párhuzamosan tojásméret növekedés figyelhető meg.

A kelési százalék - hasonlóan a handling stresszné tapasztaltakkal – az éter stresszt követően is mintegy 18 százalékkal alacsonyabb értéket mutatott (20. táblázat)

20. táblázat A kelés alakulása az éter-stressz csoportban
A stresszelt csoportban 18%-kal csökkent a kelési%, amely főként a korai embrióelhalásból (I. lámpázási eredmények) adódott.

	Éter stressz	
	kontroll (%)	*stresszelt (%)*
I. lámpázáskor kiesett (10. nap)	13,67	28,90
II. lámpázáskor kiesett (25.nap)	12,45	13,93
Befulladás	11,48	12,56
Kelési%	**62,40%**	**44,61%**

Az F1 generációban a szekunder ivararány eltérő volt a két csoportban. A kontroll csoport kikelt utódai (n=46) között 46% gácsér: 54 % tojó, míg az éter csoportban ez az arány: 59% gácsér: 41% tojó volt (n=42).

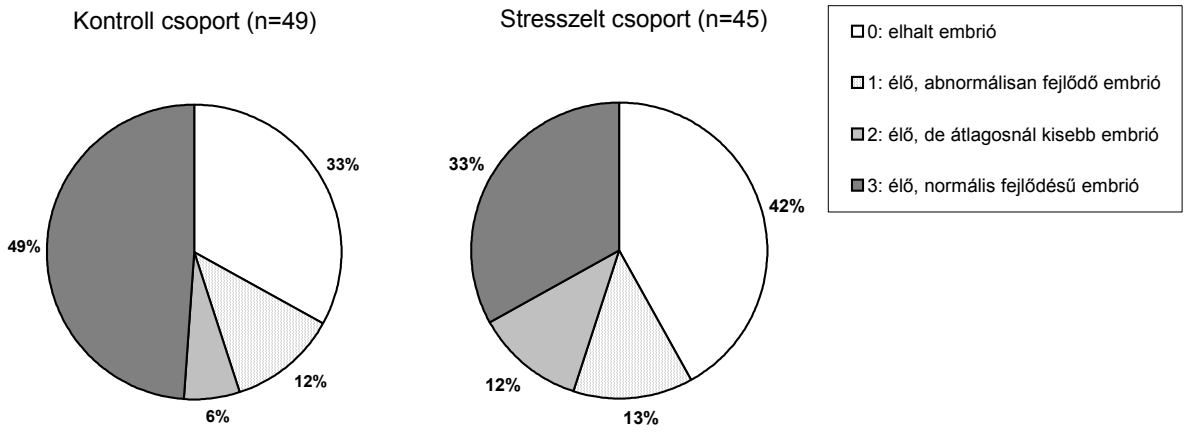
Éter stressz hatására -a handling stresszel ellentétben- a naposkori testtömeg is elmaradt a kontrollhoz képest (*21. táblázat*). További különbség az is, hogy a 4. élethéten már nem volt a testtömegben szignifikáns különbség a csoportok utódai között.

21. táblázat Az utódok testtömegének alakulása az éter stresszt követően
Éter-stressz hatásaként a naposkorban és az 1 hetes élethéten is elmaradt a testtömeg a kontroll csoporthoz viszonyítva

	napos	1 hetes	4 hetes
A maternális *éter stresszt* követő F1 testtömeg alakulása (gramm)	31,97[a] ±4,81	78,0 [b] ±11,1	553,7 ±74,6
Kontroll csoport *(gramm)*	36,06[a] ±4,64	97,43[b] ±6,53	584,7 ±68,8

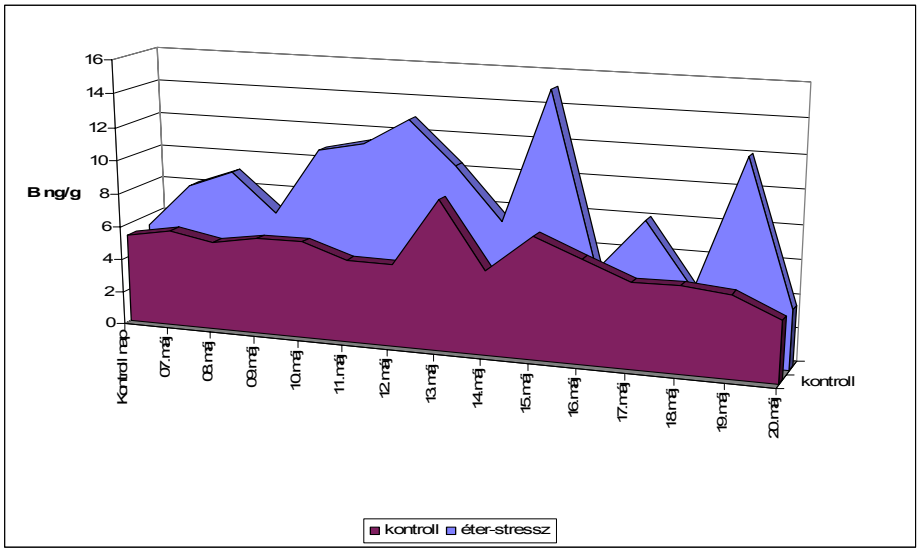
[a, b]: p<0,001 [c,d]: p<0,05 (ANOVA)

A szikanalízis vizsgálatokban a 84 óra hosszat inkubált tojásokban a kezelt csoportban megnőtt az elhalt és az élő, de átlagosnál kisebb embriók aránya, azaz csökkent az élő, nomális fejlődést mutatók aránya (*30. ábra*).



30. ábra Éter-stresszt követően az embriók állapota 84 óra inkubálás után
*Éter stressz hatására nőtt az elhalt embriót (**0**) illetve élő, de az átlagosnál kisebb embriót tartalmazó (**1**) tojások aránya.*

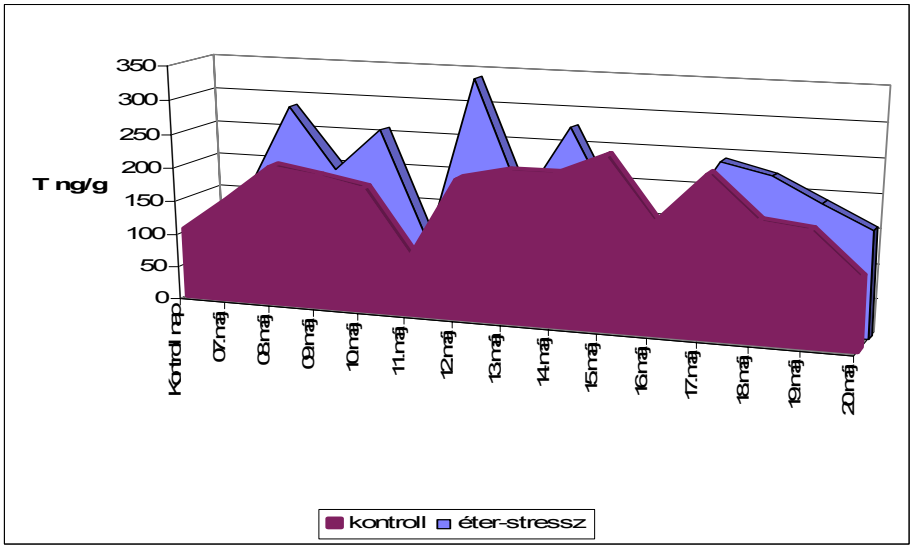
A stressz hatására a kéthetes vizsgálati periódusban a kezelt csoport B produkciója 58 százalékkal magasabb értéket mutat a kontroll csoporthoz képest (*31. ábra*); ez az érték a görbe alatti terület számításával igazolható. A kontroll csoport görbe alatti területe 79,355, míg a stressz csoport értéke 125,035 (Microcal Origin 3.5). Ha csak a 10 napos periódust veszünk figyelembe, minthogy a handling stressznél is inkább a 10 napig volt markáns különbség a hormonszinteket tekintve a két csoport közt, akkor ez a különbség 67%-ra emelkedik a kezelt csoport javára.



31. ábra A tojók fekális kortikoszteron értékeinek alakulása az éter-stresszt követően (B ng/ 1 g szik)

Éter-stressz hatására nőtt a bélsár kortikoszteron tartalma

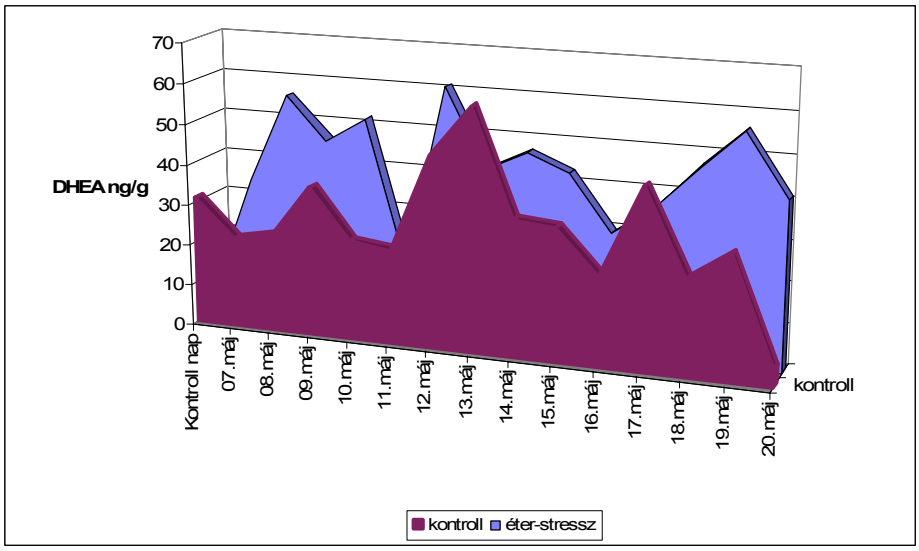
A vizsgálati periódus alatt a stresszkezelés hatására 10,5 %-kal nőtt a bélsárból kimutatható T ekvivalens mennyisége (*32. ábra*).



32. ábra A tojók fekális tesztoszteron értékeinek alakulása az éter-stresszt követően (T ng/ 1 g szik)

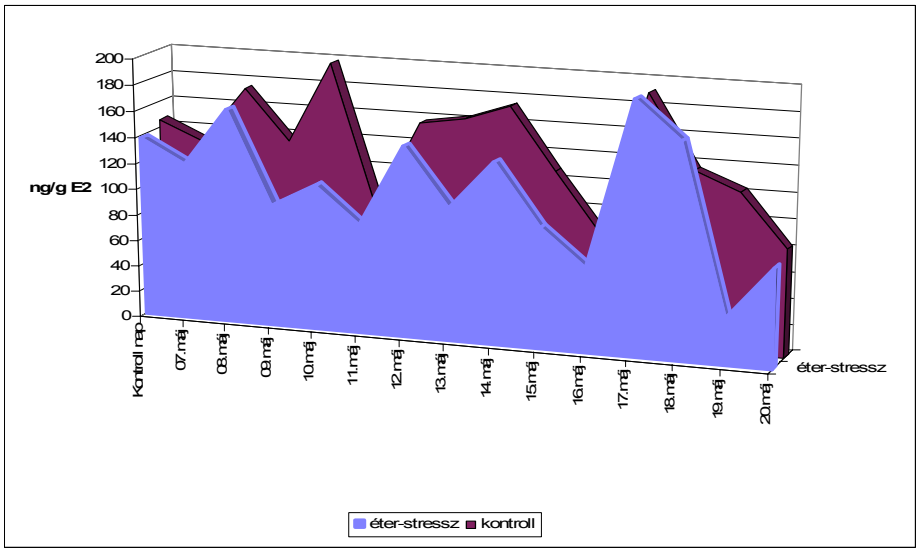
Éter-stressz hatására nőtt a bélsár T tartalma

A vizsgálati periódusban a kezelés hatására a tesztoszteronnal teljesen azonos mértékben 10,5 %-kal nőtt a bélsárból kimutatható DHEA ekvivalens mennyisége is (*33. ábra*).



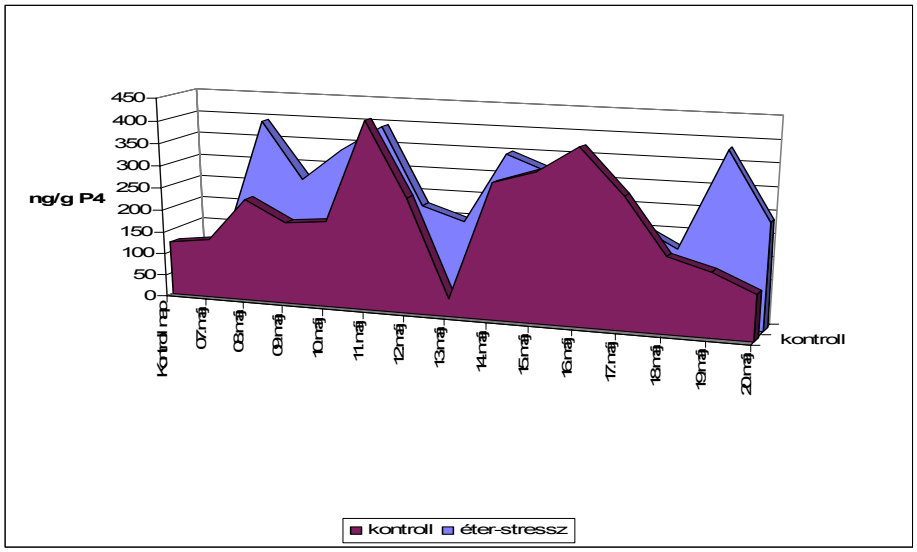
33. ábra A tojók fekális DHEA értékeinek alakulása az éter-stresszt követően (DHEA ng/ 1 g szik)
Éter-stressz hatására nőtt a bélsár DHEA ekvivalens tartalma

A vizsgálat időszakban 19,1 %-kal csökkent a bélsárból kimutatható E2 ekvivalens mennyisége a kezelt csoportban (*34. ábra*). Ha csak a 10 napos időtartamot vizsgáljuk, akkor 21,4 százalékos ez a csökkenés.



34. ábra A tojók fekális E2 értékeinek alakulása az éter-stresszt követően (E2 ng/ 1 g szik)
Éter-stressz hatására csökkentek a bélsárból kimutatható E2 ekvivalens mennyiségek

A kezelt csoportban 18,6 %-kal nőtt a bélsárból kimutatható P4 ekvivalensek mennyisége a vizsgálat során (35. ábra). Ha csak a 10 napos időtartamot vizsgáljuk, akkor 23,2 százalékos volt ez az emelkedés. Ellentétben a handling stressznél tapasztaltakkal, ott ugyanis P4 csökkenés történt, majd a 10. naptól emelkedés.



35. ábra A tojók fekális P4 értékeinek alakulása az éter-stresszt követően (P4 ng/ 1 g szik)
Éter-stressz hatására nőtt a bélsár P4 ekvivalens tartalma

A következő öt összefoglaló táblázat (*22.-26.*) bemutatja a tojókban mérhető szteroid koncentrációváltozásokat, majd ezt követően a tojásszikben detektálható hormonmennyiségeket, végül a kikelt utódok plazma szteroid szintjeit.

22. táblázat Éter stressz-terhelés és kortikoszteron interakciója

	Kezelt csoport			Kontroll csoport		
	Tojóknál 58%-kal magasabb B koncentráció (bélsár)					
Tojásszik ng/g	♀ embriót tartalmazó		♂ embriót tartalmazó	♀ embriót tartalmazó		♂ embriót tartalmazó
	1,75±0,48 ng/g	= NS	2,12±0,89 ng/g	1,14±0,27 ng/g	< p=0,01	1,69±0,41 ng/g
		p<0,001			p=0,03	
4 hetes utód vérplazma ng/ml	♀ utód		♂ utód	♀ utód		♂ utód
	0,77±0,21 ng/ml	< p=0,01	1,36±0,56 ng/ml	0,68±0,26 ng/ml	< p=0,02	1,19±0,33 ng/ml

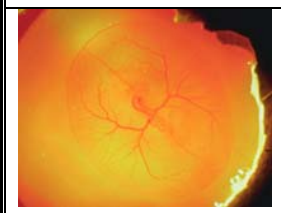
A *kortikoszteron és éter stressz-terhelés interakciója* összefoglaló táblázat (***22.***) ismerteti, hogy a tojóknál detektált 58%-os B koncentráció emelkedés megjelenik a tojásszikben is, emellett mind a nőivarú-, mind a hímivarú embriókat tartalmazó tojásokban is szignifikáns emelkedést tapasztaltunk. A kontroll csoport hímivarú embrióit tartalmazó tojásainál szignifikánsan magasabb B szintet mértünk, mint a nőivarú embriót tartalmazóknál A 4 hetes utódoknál (F1) a csoportok közt már nem volt statisztikailag értékelhető különbség, azonban mindkét csoport hímivarú utódainál –a nőivarúakhoz képest- szignifikáns különbséget tudtunk igazolni.

23. táblázat Éter stressz-terhelés és tesztoszteron interakciója

	Kezelt csoport			Kontroll csoport		
	Tojóknál: megemelkedett fekális koncentráció (+10,5%)					
Tojásszik ng/g (84 h)	♀ embriót tartalmazó		♂ embriót tartalmazó	♀ embriót tartalmazó		♂ embriót tartalmazó
	47,22±14,33 ng/g	< p=0,0001	73,66±16,64 ng/g	38,30±10,02 ng/g	< p<0,0001	67,49±14,72 ng/g
	p=0,023					
4 hetes utód vérplazma ng/ml	♀ utód		♂ utód	♀ utód		♂ utód
	0,39±0,17 ng/ml	< p=0,01	0,45±0,22 ng/ml	0,20±0,08 ng/ml	= NS	0,21±0,10 ng/ml
	p=0,01				p=0,003	

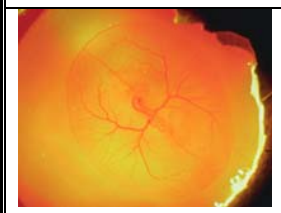
A *tesztoszteron és éter stressz-terhelés interakciója* (***23.***) összefoglaló táblázat ismerteti, hogy a tojóknál mért T koncentráció emelkedés megjelenik a szikbe deponált szteroidok koncentrációjában is. Ez esetben –ellentétben a handling stresssznél tapasztaltnál- csak a nőivarú embriót tartalmazó tojás szikanyagában tudtunk statisztikailag is igazolható különbséget kimutatni. Mindkét csoportban ivari különbséget tudtunk kimutatni, hímembriót tartalmazóknál magasabb koncentráció. A 4 hetes utódok vérplazmájában pedig az éter csoport utódainál jelentős szignifikáns különbséget igazoltunk mindkét ivart tekintve, sőt a kontroll csoport utódainál ivari különbséget is detektáltunk, azaz a hímeknél mindig magasabb T érték volt mérhető.

24. táblázat Éter stressz-terhelés és dehidro-epiandroszteron interakciója

	Kezelt csoport			**Kontroll csoport**		
	Tojóknál 10,5%-os koncentráció-emelkedés (bélsár)					
Tojásszik ng/g (84 h)	♀ embriót tartalmazó		♂ embriót tartalmazó	♀ embriót tartalmazó		♂ embriót tartalmazó
	5,70±2,99 ng/g	< p=0,0001	19,94±8,79 ng/g	6,57±4,70 ng/g	< p=0,0001	20,96±4,68 ng/g
4 hetes utód vérplazma ng/ml	♀ utód		♂ utód	♀ utód		♂ utód
	0,22±0,07 ng/ml	< p=0,01	0,41±0,11 ng/ml	0,25±0,04 ng/ml	= NS	0,28±0,06 ng/ml
					p<0,001	

A másik androgénnél, a *DHEA* (*24. táblázat*) esetében a tojóknál egy kismértékű (10,5%-os) emelkedést tapasztaltunk. A csoportok közt nem találtunk különbséget, azonban ivari különbség fedezhető fel, azaz a hímembriókat tartalmazó tojásokban szignifikánsan magasabb e szteroid szint. A juvenilis állatoknál a kontroll csoportban eltűnik ez az ivari különbség, míg a kezelt csoportban a szikhez hasonló eredményt kaptunk, a hím utódoknál magasabb a hormonszint.

25. táblázat Éter stressz-terhelés és 17-β-ösztradiol interakciója

	Kezelt csoport			**Kontroll csoport**		
	Tojóknál: 19%-kal csökkent koncentráció (bélsár)					
Tojásszik ng/g (84 h)	♀ embriót tartalmazó		♂ embriót tartalmazó	♀ embriót tartalmazó		♂ embriót tartalmazó
	18,58±3,72 ng/g	< p<0,01	27,32±3,37 ng/g	19,72±6,35 ng/g	< p<0,01	25,07±5,76 ng/g
4 hetes utód vérplazma ng/ml	♀ utód		♂ utód	♀ utód		♂ utód
	0,48±0,12 ng/ml	> p<0,01	0,25±0,04 ng/ml	0,41±0,08 ng/ml	> p<0,01	0,23±0,05 ng/ml

A 17-β-ösztradiol (*25. táblázat*) esetében a tojóknál az éter stressz hatására 20%-kal csökkent a mennyiség, melyet az alacsonyabb tojástermelés is jelez. A szikben a kezelés hatására nem találtunk változást. Meglepő módon mindkét csoportban a hímivarú embriót tartalmazó tojásokban szignifikánsan magasabb E2 szintet mértünk. A juvenilis állatokban (F1) - mindkét csoportban - a nőivarú utódokban mértünk magasabb E2 szintet, a csoportok között nem volt szignifikáns különbség.

26. táblázat Éter stressz-terhelés és progeszteron interakciója

	Kezelt csoport			Kontroll csoport		
	Tojóknál: 19 %-os P4 szint növekedés (bélsár)					
Tojásszik ng/g (84 h)	♀ embriót tartalmazó		♂ embriót tartalmazó	♀ embriót tartalmazó		♂ embriót tartalmazó
	36,38±27,66 ng/g	< p=0,03	56,03±11,88 ng/g	25,86±14,14 ng/g	< P=0,02	47,74±25,06 ng/g
	←	p=0,007	→	→		
4 hetes utód vérplazma ng/ml	♀ utód		♂ utód	♀ utód		♂ utód
	0,14±0,05 ng/ml	= NS	0,19±0,04 ng/ml	0,09±0,04 ng/ml	= NS	0,16±0,07 ng/ml
	←	p<0,05	→	→		

A *progeszteron* (*26. táblázat*) esetében a tojóknál 18,4 %-os koncentráció emelkedés tapasztalható. Ez a megnövekedett hormon koncentráció a szikben is megjelenik, a kezelt csoport nőivarú embrióit tartalmazó szikben ez a különbség statisztikailag is igazolható. Handling stresszel ellentétesen itt ivari különbséget találtunk, a hímivarú embriót tartalmazó tojásokban magasabb P4 étékeket mértünk. A juvenilis madarakban az ivari különbségek eltűntek, valamint –a szikhez hasonlóan- a kezelt csoport nőivarú utódainál szignifikánsan magasabb P4 plazma koncentrációt mértünk.

Összefoglalva: Az éter stressz hatása *a hímivarú embriót* tartalmazó tojásokban:

-Kortikoszteron koncentráció emelkedés (↑)

Az éter stressz hatása *a nőivarú embriót* tartalmazó tojásokban:

- Kortikoszteron koncentráció emelkedés (↑)

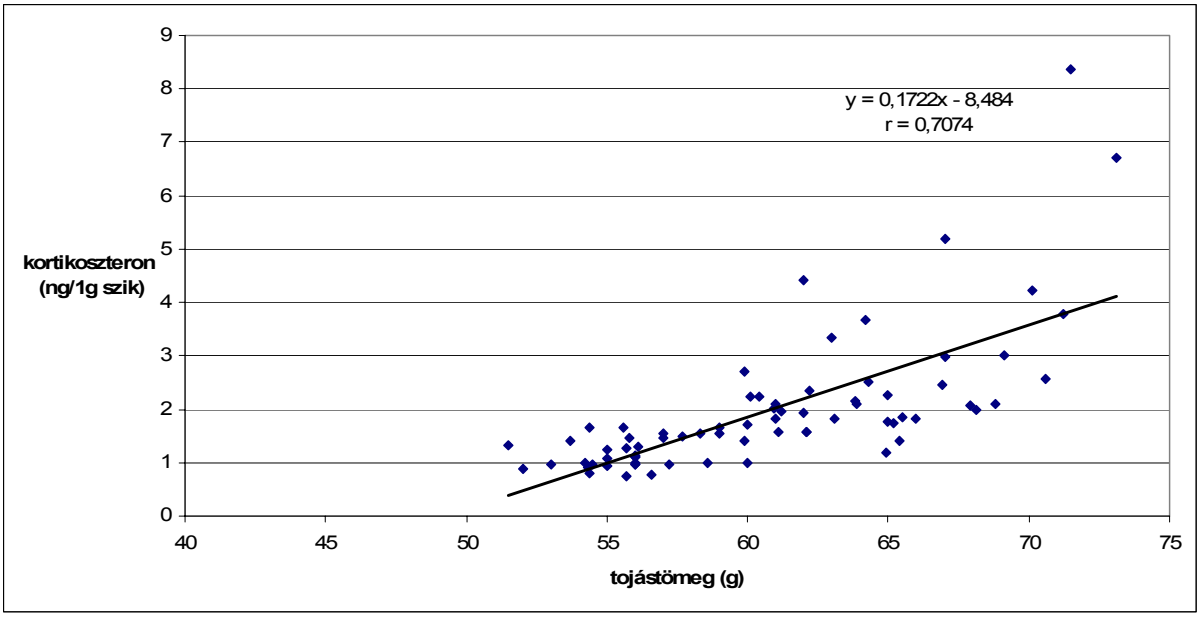
- Tesztoszteron koncentráció emelkedés (↑)
- Progeszteron koncentráció emelkedés (↑)

27. táblázat Az embriók állapota és a szik kortikoszteron koncentráció valmint tojástömeg összefüggései az éter inhaláció után

Az elhalt embriót tartalmazó tojásszikből mindkét csoportban magas B szint volt kimutatható, valamint a magas koncentráció - függetlenül a kezeléstől - tojástömeg-növekedéssel párosult. Az élő, normál fejlődésű embriót tartalmazó tojások mindkét paraméterben megegyeztek

		0: elhalt embrió	1: abnormális embrió	2: élő, de átlagnál kisebb	3: élő, normál embrió
B konc ng/g	kontroll	1,97±0,72	1,63±0,55	1,12±0,29	1,30±0,23
	Szignifikancia (ANOVA)	NS	NS	p=0.004	NS
	kezelt	2,11±0,85	1,75±0,11	1,96±0,35	1,39±0,32
Tojástömeg (g)	kontroll	59,48±2,64	48,05±1,55	55,13±3,86	54,68±3,74
	Szignifikancia (ANOVA)	NS	NS	NS	NS
	kezelt	59,77±4,95	46,65±1,35	57,10±4,01	54,77±3,99

A fenti (*27.*) táblázatból kitűnik, hogy az elhalt embriót tartalmazó tojászikből mindkét csoportban magas glükokortikoid szint volt kimutatható. A magas koncentráció mind a kontroll, mind a kezelt csoport tojásainál tojástömeg-növekedéssel párosult. Az abnormális embriókat tartalmazó tojások tekintetében, -a handlingnél tapasztalttal ellentétesen- a csoportok közt nem találtunk különbséget. Érdekes módon itt volt mindkét csoportban a legalacsonyabb a tojástömeg. Az élő, de kisebb embriókat tartalmazó tojásoknál az éter stressz csoportban szignifikánsan magasabb B koncentrációk mérhetők, de a tojásméretben nem találtunk statisztikailag is értékelhető különbséget. Az élő, normál embriót tartalmazó tojások mindkét paraméterben megegyeztek.



36. ábra A kezelt csoport tojástömeg és szik-kortikoszteron szint összefüggései
A tojástömeg növekedésével párhuzamosan nőtt a szik kortikoszteron tartalma

Itt is a megnövekedett tojástömeg és a B koncentráció (36. ábra) között erős, pozitív korrelációt találtunk (r=+0,7984).

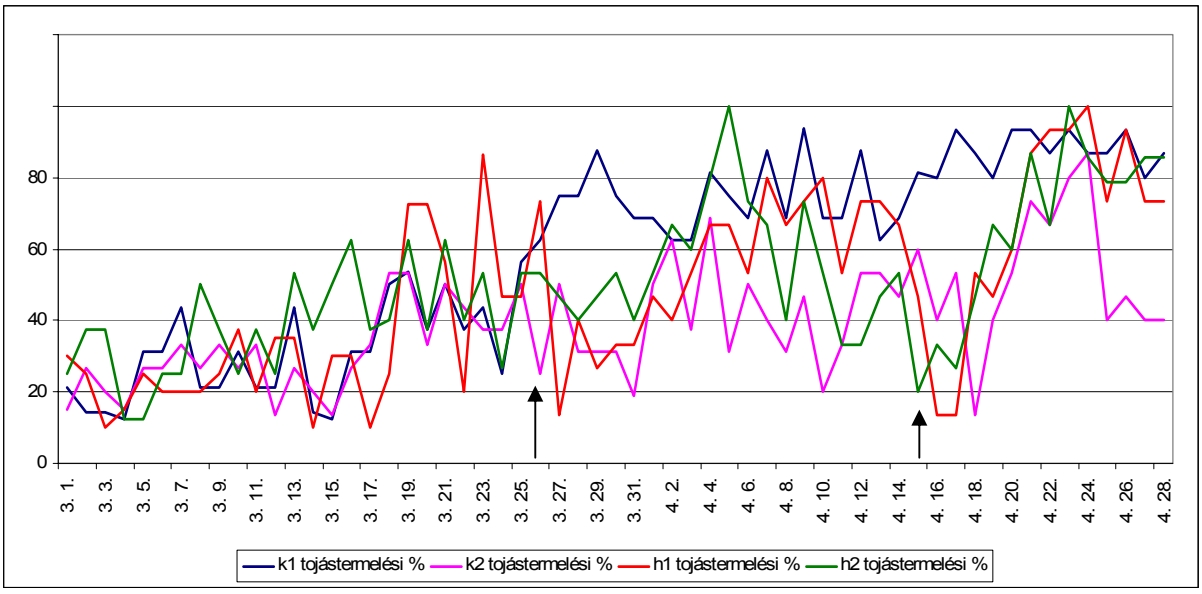
4.5. 2003. évi stressz vizsgálatok az F1 (szülő) generáción

A kontroll és handling kísérleti csoportokból származó F1 nemzedékek vizsgálata az alábbi csoportbontásban történt:

- K1: az előző évi kontroll (1.) csoport utódai, semmilyen kezelést nem kaptak
- K2 (S): az előző évi kontroll csoport (1.) utódai, melyek a stresszkezelést kaptak
- H1 (S): az előző évi handling csoport (2.) utódai, melyek stresszkezeléseket kaptak
- H2: az előző évi handling csoport (2.) utódai, semmilyen kezelést nem kaptak

A csoportok kialakításánál véletlenszerűen válogattuk az egyedeket.

A felnevelés során az ivarérésben jelentős különbséget találtunk: a kontroll csoport egyedeinél a 2002-es év decemberében már termékeny tojásokat észleltünk. Míg a handling stresszkezelést kapó tojók utódainak ivarérése csak január végén, 6 héttel később következett be. A termékenységet inkubálással teszteltük, így igazoltuk mindkét ivar maturációját.



37. ábra A tojástermelés alakulása a 2003-as reprodukciós ciklusban, az F1 generációban
A nyíllal (↑) megjelölt időpontokban történtek a stresszkezelések, az első időpontban a handling-, másodikban pedig az éter-stressz kezelés okozta tojástermelési depresszió látható.

A fenti ábrán (***37.***) látható, hogy a stresszkezelések előtt a 4 csoport tojástermelése hasonlóképpen alakul.

A kísérletek megkezdése előtt a tojásméret mind a négy csoportban megegyezett (28. táblázat).

28. táblázat Tojástömeg alakulása a stresszkezelések előtt
A csoportok közt különbséget nem találtunk, a tojástömeg mindenhol azonosnak tekinthető.

	K1	K2 (S)	H1 (S)	H2
Tojástömeg (g)	60,87±4,40	60,86±4,19	60,50±4,77	59,76±4,45

29. táblázat Az embriók állapota a 84 órás inkubáció után a stressz kísérletek előtt
A kontroll csoport utódainál (K1 és K2) az élő, normál embriót tartalmazó tojások aránya 80 % körüli, míg a stressz kezelés után kikelt utódok ez az alapérték az élő, normál embriót tekintve csak kb.: 65%.

	K1	**K2 (S)**	**H1 (S)**	**H2**
0: elhalt embrió	8,3%	5,9%	9,6%	7,5%
1: abnormális embrió	-	2,9%	2,7%	10%
2: élő, de átlagnál kisebb	5,5%	8,8%	20,5%	12,5%
3: élő, normál embrió	80,8%	76,6%	64,5%	65%
BWE (Blastoderm without embryo)	2,7%-	2,9%	-	-
PD (positive development)	2,7%	-	-	-
terméketlen	-	2,9%	2,7%-	5%
Vizsgált tojásszám	36 db	34 db	73 db	40 db

A fenti (*29.*) táblázatból kitűnik, hogy a kontroll csoport utódaiból random kialakított két csoport K1 és K2-nél az élő, normál embriót tartalmazó tojások aránya 80 % körül alakult, míg a stressz kezelés után kikelt utódok alapértéke az élő, normál embriót tekintve csak 65% volt.

A kísérletek előtt végeztünk egy próbakeltetést: a K1 csoport kelési sikere 75%-os volt a K2 csoportnál ez az érték: 82,35%, a handling csoportoknál: H1: 70%, H2-nél: 68,75% volt a kelési százalék berakott tojásra vetítve. Azaz a maternális stressz kezelés kihatott az utódok reprodukciós képességére is.

A kezelés előtti periódusban a szekunder ivararány következőképpen alakult a csoportokban (F2 generáció):

K1: 53%♀ és 47% ♂ (n=85)

K2: 54%♀ és 46% ♂ (n=75)

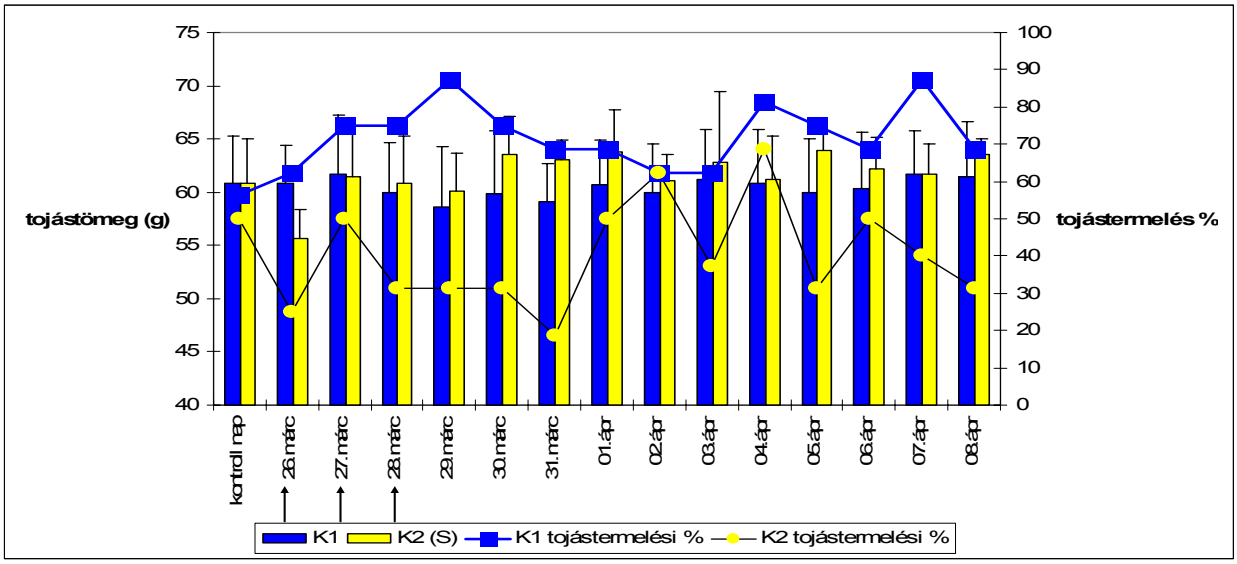
H1: 48%♀ és 52% ♂ (n=125)

H2: 50%♀ és 50% ♂ (n=88)

Tehát a handling stressz kezelést kapott tojók F2 generációjában magasabb arányú volt a hímivar, mint a kontroll csoport F2-es utódainál.

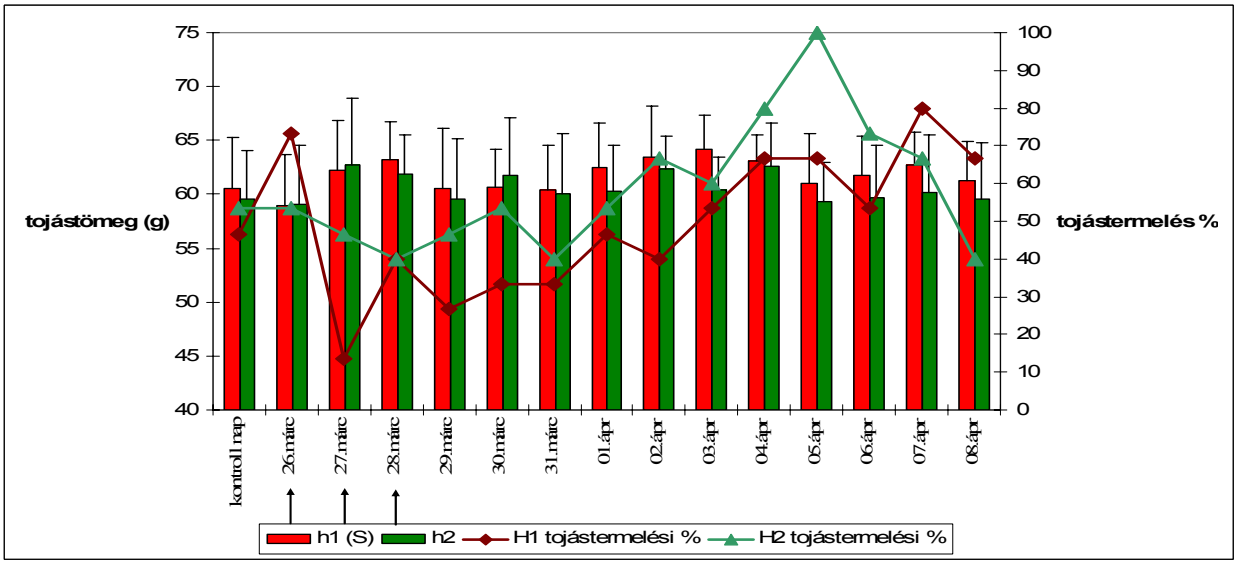
4.5.1. Handling stressz vizsgálatok az F1 generációban

A handling kezelést követően stressz csoportokban (K2 és H1) tojástermelés visszaesését figyelhetjük meg különösen az első kezelést követő 5.-6. napig (*38.-39. ábra*), ezzel párhuzamosan kismértékben emelkedett a tojástömeg (*30. táblázat*).



38. ábra Tojástermelés és tojástömeg alakulása a K1-K2 csoportokban a handling stressz során

A nyíllal (↑) megjelölt időpontokban történtek a handling kezelések, az első kezelést követő 5. napig csökkent tojástermelést figyelhetünk meg, ezzel párhuzamosan tojásméret növekedést rögzítettünk.



39. ábra Tojástermelés és tojástömeg alakulása a K1-K2 csoportokban a handling stressz során

A nyíllal (↑) megjelölt időpontokban történtek a handling kezelések, az első kezelést követő 6. napig csökkent tojástermelést figyelhetünk meg, ezzel párhuzamosan tojásméret növekedést rögzítettünk

A K1 és K2(S) csoport között- az első évhez hasonlóan- a tojástömeg emelkedés az össztojásszámot tekintve is szignifikáns eredményt mutat. E két csoport közt tűnik markánsabbnak a tojástermelés visszaesése is (10, 67 db tojás/tojó: 5,93 db tojás/tojó). A H1(S)-H2 csoport összehasonlításánál kisebb mértékű tojástermelés visszaesést, valamint kismértékű tojásméret növekedést detektáltunk (*30. táblázat*).

30. táblázat Tojástömeg alakulása a handling stressz kísérlet során

Stresszkezelés hatására csak a K2 csoportban nőtt az átlagos tojástömeg és az egy tojóra jutó tojásszám is itt a legalacsonyabb.

Tojástömeg (gramm)	**K1**	**K2 (S)**	**H1 (S)**	**H2**
kontroll nap	60,87±4,39	60,37±4,19	60,5±4,77	59,53±4,57
1. stressz nap	60,82±3,59	55,65±2,75	58,98±4,74	59,07±5,43
2. stressz nap	61,75±5,45	61,50±4,81	62,30±4,53	62,77±6,10
3. stressz nap	60,00±4,60	60,86±4,37	63,27±3,44	61,90±3,65
4. nap	58,65±5,57	60,06±3,57	60,58±5,54	59,60±5,58
5.nap	59,79±5,92	63,58±3,48	60,64±3,59	61,71±5,42
6. nap	58,41±3,35	63,10±1,76	60,38±4,13	60,11±5,59
7.nap	60,67±4,26	63,76±4,00	62,46±4,17	60,35±4,18
8.nap	59,98±4,54	61,12±2,44	63,48±4,76	62,34±3,12
9. nap	61,17±4,75	62,80±6,60	64,13±3,25	60,37±3,1
10.nap	60,80±5,03	61,19±4,02	63,09±2,47	62,64±4,01
11. nap	59,91±5,11	63,92±1,86	61,05±4,55	59,30±3,64
12. nap	60,37±5,31	62,23±2,89	61,81±3,59	59,67±4,92
13. nap	61,65±4,09	61,65±2,93	62,75±2,96	60,18±5,37
14. nap	61,43±5,18	63,56±1,49	61,30±3,56	59,52±5,27
Szumma tojástömeg	**60,43±4,97** n=160	**61,83±4,0** n=89	**61,76±4,13** n=105	**60,83±4,90** n=120
Medián	60,9	61,5	62,05	61,25
Tojás db/ tojó	*10,67*	*5,93*	*7,00*	*8,00*
Szignifikancia (ANOVA)	**K1- K2 (S)**	**H1 (S)- H2**	**K2 (S)- H1 (S)**	**K1-H2**
kontroll nap	NS	NS	NS	NS
1. stressz nap	P=0.04	NS	NS	NS
2. stressz nap	NS	NS	NS	NS
3. stressz nap	NS	NS	NS	NS
4. nap	NS	NS	NS	NS
5.nap	NS	NS	NS	NS
6. nap	P=0.04	NS	NS	NS
7.nap	NS	NS	NS	NS
8.nap	NS	NS	NS	NS
9. nap	NS	P=0.04	NS	NS
10.nap	NS	NS	NS	NS
11. nap	P=0.04	NS	P=0.01	NS
12. nap	NS	NS	NS	NS
13. nap	NS	NS	NS	NS
14. nap	NS	NS	NS	NS
Szumma tojástömeg	**P=0.02**	NS	NS	NS

4.5.1.1. Az éter stressz hatása az F2 generáció embrionális fejlődésre

A handling stressz hatására tojásokból csökkent a kikelő utódok száma (*31. táblázat*). A kezelések hatására 2,5-szeresére nőtt a korai embrió elhalás mértéke. A késői elhalásokat már nem befolyásolták a handling kezelések egyik csoportban sem. A befulladás magas értéke mind a négy csoportnál keltetési hibára utal, ezt alátámasztják a korábbi, ill. későbbi keltetési eredmények is (*11., 20. és 43. táblázatok*). Összeségében, a handling stressz mintegy 10-15 százalékkal csökkentette a kelési sikert. A kezelt csoportokban (K2 és H1) a fiókák tömeges kelése mintegy 12 órával megelőzte az abszolút kontroll (K1) csoportét, hasonlóan az előző évben tapasztaltakhoz képest.

31. táblázat A kelés alakulása az F2 generációban a handling stresszkezelések után. A handling stressz mintegy 10-15%-kal csökkentette a kelés eredményességét a különbség a korai elhalásból adódott.

	K1	*K2 (S)*	*H1 (S)*	*H2*
I. lámpázáskor kiesett (10. nap)	8,33%	21,05%	21,15%	8,06%
II. lámpázáskor kiesett (25.nap)	3,33%	3,51%	5,77%	6,45%
Befulladás	18,34%	15,80%	19,23%	17,74%
Kelési%	**68,33%**	**59,64%**	**53,85**	**67,75%**

A szikanalízisekre 84 óra hosszat inkubált tojásokban vizsgáltuk az embriók állapotát, és hasonló tendenciát találtunk, mely szerint a kezelt csoportokban megnőtt az elhalt embriók aránya (32. táblázat). Különbséget találtuk az abszolút kontroll (K1) csoport és handling stressz kezelést kapott tojók H2-es utódai között, azaz a kontroll körülmények ellenére 15 %-kal alacsonyabb volt az élő, normális fejlődést mutató embriók aránya.

32. táblázat Az embriók állapota 84 órás inkubáció után az F1 generáció tojásaiban
A K2 csoportban 39%-kal, a H1 csoportban 11%-kal csökkent az élő, normális fejlődést mutató embriók aránya.

	K1	**K2 (S)**	**H1 (S)**	**H2**
0: elhalt embrió	1,8 %	26,7%	15,8%	8,5%
1: abnormális embrió	1,8 %	-	7,9%	-
2: élő, de átlagnál kisebb	15,5%	33,3%	21,1%	27,7%
3: élő, normál embrió	79,1%	40,0%	52,6%	63,8%
BWE (Blastoderm without embryo)	-	-	2,6%	-
PD (positive development)	-	-	-	-
terméketlen	1,8 %	-	-	-
Vizsgált tojásszám	55 db	30 db	38 db	47 db

A kiskacsák (F2) testtömegei a K1 és K2 csoportban mindvégig megegyeztek. A H1-es csoport utódai szignifikánsan magasabb testtömeget mutattak napos- ill. egyhetes korban, mint a kezelést nem kapó H2-es kiskacsák. (33. *táblázat*).

33. táblázat Az F2 utódok testtömegének alakulása

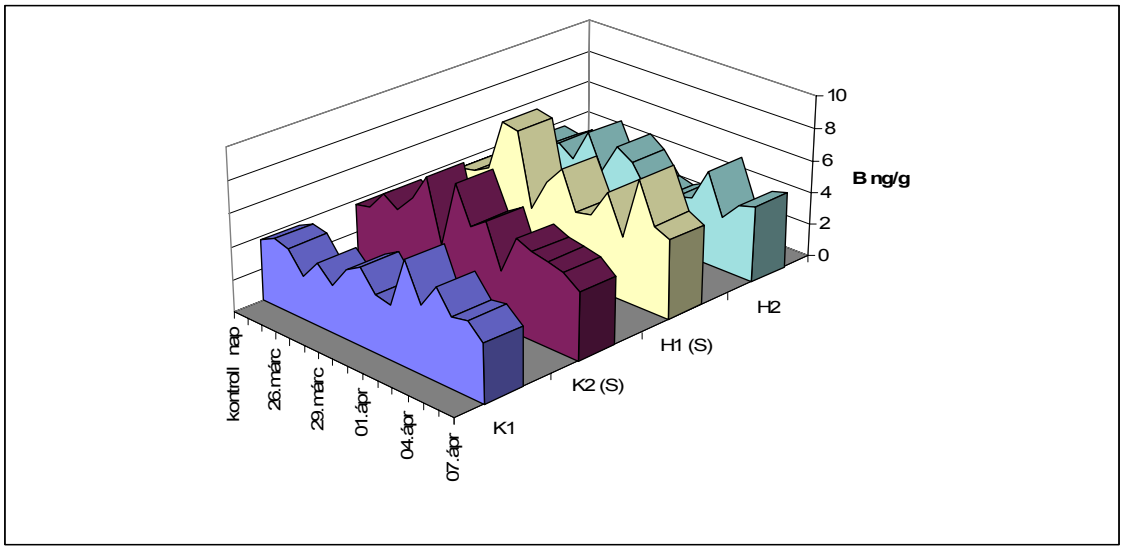
A K1 és K2 csoportokban a kiskacsák testtömege mindvégig megegyezett, a H1-es csoportban volt legmagasabb (!) a testtömeg a napos- illetve 1 hetes korban a négy csoport közül.

Testtömeg alakulása (g)	**napos**	**1 hetes**	**2 hetes**	**4 hetes**
K1	32,94±3,03	137,02±17,22	255,72±36,55	590,0±74,83
K2 (S)	32,90±2,50	128,41±21,11	238,74±37,21	577,0±78,07
H1 (S)	35,38±1,44	143,30±19,86	267,14±23,98	576,32±66,52
H2	29,95±3,02	123,97±24,34	251,78±18,77	556,96±76,00
Szignifikancia (ANOVA)	*napos*	*1 hetes*	*2 hetes*	*4 hetes*
K1-K2 (S)	NS	NS	NS	NS
H1(S)-H2	p<0,01	p<0,01	NS	NS
K2 (S)-H1 (S)	p<0,01	p<0,05	NS	NS
K1-H2	p<0,01	p<0,05	NS	NS

4.5.1.2. Szteroid vizsgálatok

4.5.1.2.1. Kortikoszteron eredmények

A handling stressz után a tojóknál megnőtt a bélsárban mérhető *kortikoszteron* koncentráció (*40. ábra*), statisztikailag (a görbe alatti területszámítással) K2(S) csoportnál 23,4 %-kal magasabb ez az érték, míg a H1(S) csoport fekális koncentrációi 33,5 % mutatnak emelkedett szintet a teljes vizsgálati periódust alatt. A K1 és H2 csoport fekális B koncentrációit tekintve hasonló értéket mutatott



	terület	%		terület	%
K1	62,2	100	H1	81,49	131,0
K2	76,775	123,4	H2	60,67	97,5

40. ábra Bélsár kortikoszteron koncentrációk az F1 generáció a 4 csoportjának tojóinál
Handling stressz hatására 23%-kal (K2 csoport), illetve 33%-kal (H1 csoport) emelkedett meg a fekális B tartalom

Ezzel párhuzamosan a K1-K2 (S) csoportoknál: tojásszikben is detektálható szignifikáns emelkedés mind a nőivarú-, mind a hímivarú embriót tartalmazó tojások szikanyagát tekintve, azonban a H1(S)-H2 összehasonlításánál csak a nőivarú embriót tartalmazó tojásoknál tudtunk szignifikáns emelkedést igazolni. A 4 hetes utódoknál a csoportok közt nem volt statisztikailag értékelhető különbség, azonban minden csoport hímivarú utódainál –a nőivarúakhoz képest- szignifikáns emelkedést tudtunk igazolni (*34. táblázat*). Az abszolút kontroll csoportot összevetve a H2-es kontroll csoporttal a hímivarú embriót tartalmazó tojásszikben szignifikánsan magasabb B szintet mértünk (ANOVA: F:9,64, p=0,005).

34. táblázat Kortikoszteron koncentrációk alakulása az F1 generáció 4 csoportjában a handling stresszkezelések után

A bélsárban detektált megnövekedett B tartalom megjelenik a tojásszikben is, a négy hetes utódoknál a csoportok közt nem mutatható ki szignifikáns különbség, azonban a fiatal gácsérokban mindig magasabb koncentrációt mérhető.

	K1			K2 (S)			H1(S)			H2		
Tojók (bélsár ng/ 1g)				Megemelkedett B szint (+23,4%)			Megemelkedett B szint (+33,5%)			A K1 csoporthoz viszonyítva -2,5%		
Tojásszik (ng/ 1g)	♀		♂	♀		♂	♀		♂	♀		♂
	1,25± 0,41	NS	1,33± 0,44	1,83± 0,33	NS	1,74± 0,39	2,01± 0,25	NS	2,03± 0,70	1,30± 0,36	< p<0.05	1,93± 0,45
		p<0.05			p<0.05			p<0.05				
4 hetes utódok (ng/ 1ml)	♀		♂	♀		♂	♀		♂	♀		♂
	0,67± 0,18	< p<0.05	1,26± 0,42	0,72± 0,23	< p<0.05	1,31± 0,50	0,82± 0,35	< p<0.05	1,42± 0,48	0,84± 0,29	< p<0.05	1,46± 0,42

A következő két táblázatban (*35.-36.*) a 84 órás inkubáció utáni embrióstátusz, szik-kortikoszteron koncentrációk és tojástömeg összefüggéseit vizsgáltuk.

35. táblázat Az embrióstátusz a kortikoszteron koncentráció és a tojástömeg összefüggései a handling stresszt követően a K1 és K2 (S) csoportokban

Az elhalt embriót tartalmazó tojásszikből mindkét csoportban magas B szint volt kimutatható, valamint a magas koncentráció -függetlenül a kezeléstől- tojástömeg-növekedéssel párosult. Az élő, normál fejlődésű embriót tartalmazó tojások az alacsony B szintben megegyeztek, azonban a tojáméretben nem.

		0: elhalt embrió	1: abnormális embrió	2: élő, de átlagnál kisebb	3: élő, normál embrió
B konc ng/g	K1	2,06±0,66	1,22±0,44	1,10±0,26	1,12±0,38
	Szignifikancia (ANOVA)	NS	p=0.04	p=0.04	NS
	K2 (S)	1,95±0,84	1,76±0,50	1,81±0,75	1,29±0,32
Tojástömeg (g)	K1	60,83±6,35	55,43±7,41	52,59±4,13	55,23±3,16
	Szignifikancia (ANOVA)	NS	p=0.003	p=0.004	p=0.02
	K2 (S)	62,40±4,79	63,78±6,60	61,31±6,47	58,47±3,36

A kísérlet ezen része megfelel az előző évi handling stressz vizsgálat ismétlésének (*35. táblázat*). Tendencia itt is hasonló: az elhalt embriót tartalmazó tojásszikből mindkét csoportban magas glükokortikoid szint volt kimutatható, valamint a magas koncentráció mind a kontroll, mind a kezelt csoport tojásainál tojástömeg-növekedéssel párosult. Az abnormális embriókat tartalmazó tojások

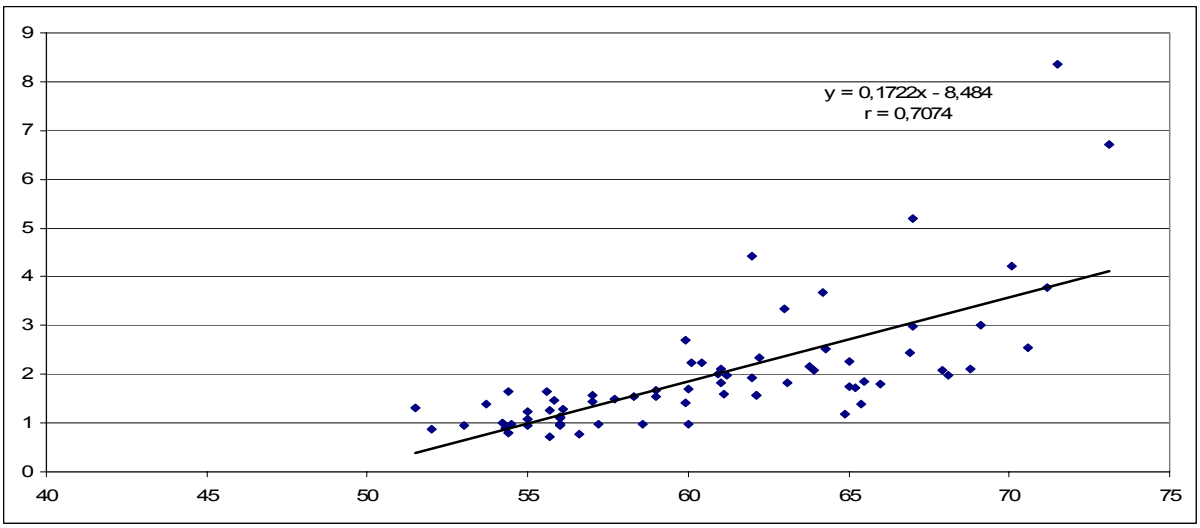
esetében, érdekes módon itt is a K1 csoportban egy alacsony, míg a kezelt csoportban magasabb B értékeket kaptunk, mely statisztikailag is igazolható, a K2 csoportnál a magasabb B, nagyobb tojásmérettel járt. Az élő, de kisebb embriókat tartalmazó tojásoknál a kontroll csoportban szignifikánsan kisebb B koncentrációk mérhetők, valamint kisebb tojástömegek is. Az élő, normál fejlődésű embriót tartalmazó tojások mindkét paraméterben megegyeztek.

36. táblázat Az embrióstátusz a kortikoszteron koncentráció és a tojástömeg összefüggései a handling stresszt követően a H2 és H1 (S) csoportokban

Az elhalt embriót tartalmazó tojásszikből mindkét csoportban magas B szint volt kimutatható, valamint a magas koncentráció -függetlenül a kezeléstől- tojástömeg-növekedéssel párosult. Az élő, normál fejlődésű embriót tartalmazó tojások mindkét paraméterben megegyeztek.

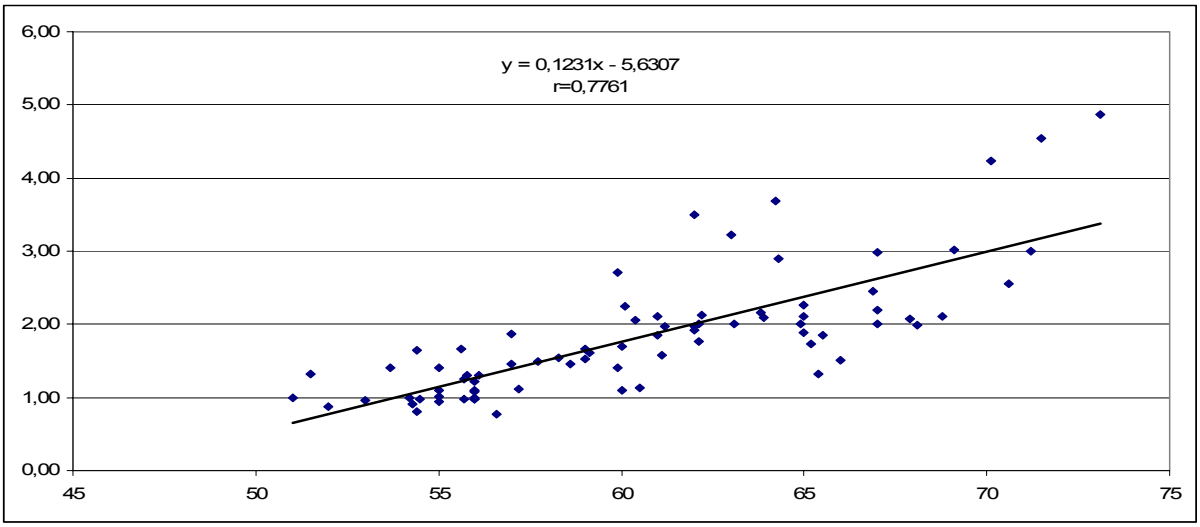
		0: elhalt embrió	1: abnormális embrió	2: élő, de átlagnál kisebb	3: élő, normál embrió
B konc ng/g	H2	2,03±0,70	1,46±0,65	1,17±0,28	1,13±0,30
	szignifikancia	NS	NS	NS	NS
	H1 (S)	2,01±0,94	1,86±0,41	1,39±1,20	1,15±0,43
Tojástömeg (g)	H2	61,11±7,03	53,25±15,06	53,02±4,13	56,54±3,08
	szignifikancia	NS	NS	p=0.01	NS
	H1 (S)	62,85±4,63	63,33±6,77	62,47±7,64	58,15±4,09

A handling stresszelt állatok F1 generációjának tojásaiban hasonló tendenciák figyelhetők meg a kontroll állatok utódainak adataihoz képest, azaz a magas B szint párosult a tojástömeg átlagának növekedésével az elhalt embriót tartalmazó tojások esetében, függetlenül kezelésektől. Ennél a kombinációnál, ahol minden szülő a kezelt tojók utóda, csak az élő, de az átlagosnál kisebb embriókat (**2**) tartalmazó tojásoknál találtunk szignifikáns különbséget csak a tojásméret változásában (*36. táblázat*).



41. ábra A K2(S) csoport tojástömeg és szik-kortikoszteron szint összefüggései

Az előző évi vizsgálathoz hasonlóan a megnövekedett tojástömeg és a B koncentráció között közepes mértékű pozitív korrelációt találtunk (r=+0,7074).

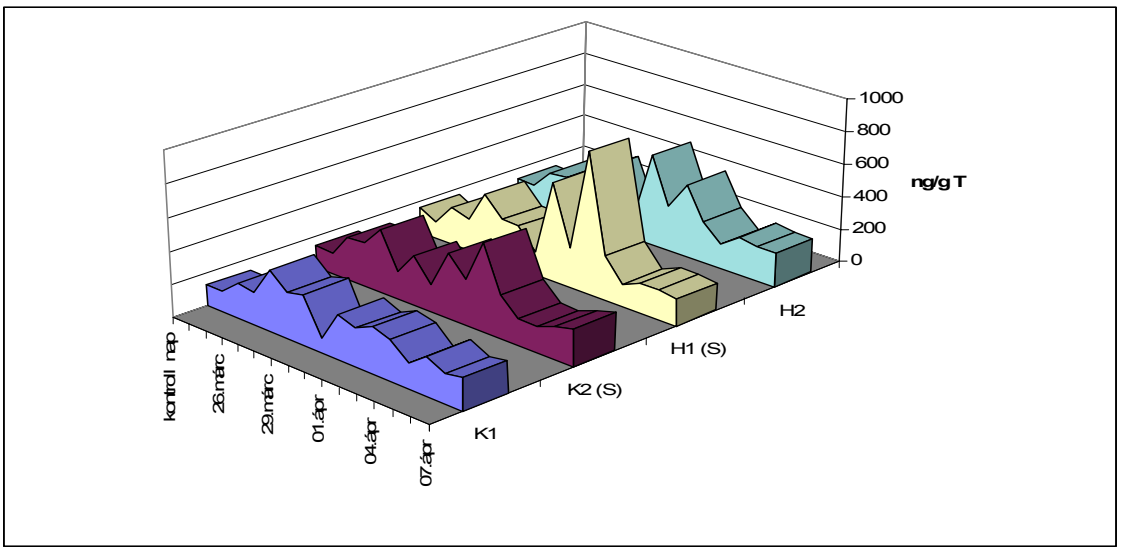


42. ábra A H1(S) csoport tojástömeg és szik-kortikoszteron szint összefüggései
A tojástömeg emelkedésével párhuzamosan nőtt a szik kortikoszteron tartalma (r=+0,77)

Ebben az esetben (42. ábra) a tojástömeg és a B koncentráció között erős pozitív összefüggést találtunk (r=+0,7761).

4.5.1.2.2. Tesztoszteron koncentráció eredmények

A fekális tesztoszteron ekvivalensek mennyiségét tekintve: K2-nél 16%-os, a H1 tojóinál 12%-os emelkedés volt mérhető. Figyelemre méltó a H2-es csoport T értéke, mely 13,8 %-kal magasabb alapértéket mutat az abszolút kontroll (K1) csoporthoz (*43. ábra*). Jellemző volt az, hogy a fiókák tömeges kelése mintegy 12 órával megelőzte K1 csoportét.



	terület	%		terület	%
K1	3346,28	100	H1	4200,97	125,5
K2	3891,13	116,3	H2	3806,86	113,8

43. ábra Bélsár tesztoszteron koncentrációk az F1 generáció a négy csoportjának tojóinál
Handling stressz hatására nőtt a bélsárban kimutatható T ekvivalens mennyisége.

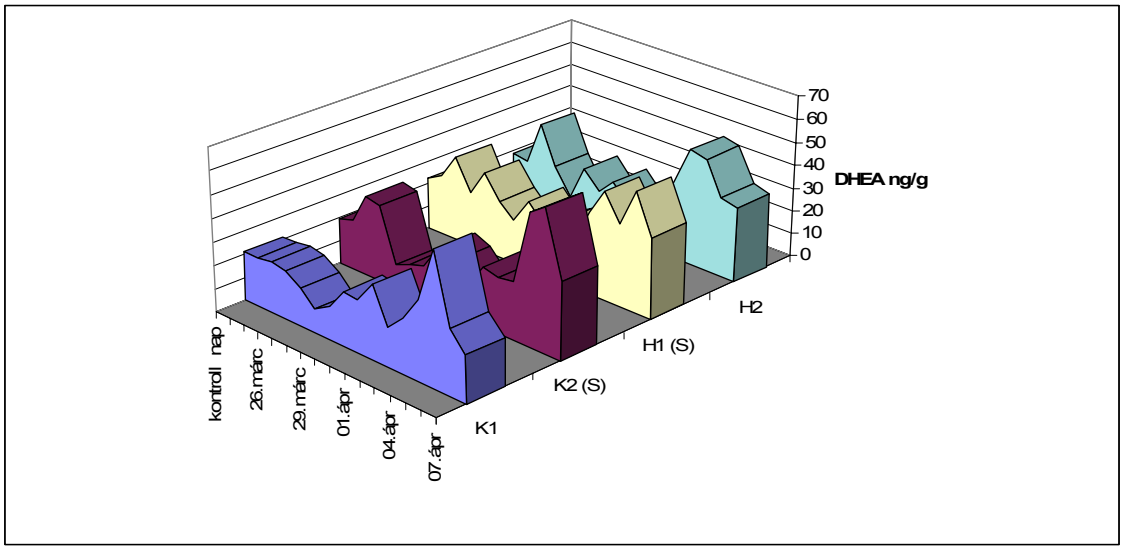
A tojók faecesében mért T koncentráció emelkedés megjelenik a szikbe deponált szteroidok koncentrációjában is. Bár itt –ellentétben az előző évi handling stresssznél tapasztaltnál, de megegyezőn a 2002-es éter stresszel - csak a nőivarú embriót tartalmazó tojás szikanyagában tudtunk statisztikailag is igazolható növekedést kimutatni. Minden csoportban ivari különbséget tudtunk kimutatni, hímembriót tartalmazóknál magasabb a T koncentráció. A 4 hetes utódok vérplazmájából mind a négy csoport utódainál ivari különbséget detektáltunk, azaz a hímeknél mindig magasabb T érték volt mérhető. A kezelés hatására pedig csak a két stresszelt csoport (H1, K2) hím utódainál tudtunk szignifikáns különbséget igazolni (*37. táblázat*).

37. táblázat Tesztoszteron koncentrációk alakulása a handling stressz kezelés után
A bélsárban detektált T emelkedés megjelenik a szikben is. Handling stressz hatására a nőivarú embriót tartalmazó tojásoknál szignifikánsan magasabb T értékeket mértünk. Mind a szikben, mind pedig a vérplazmában: a hímivarban mérhetőek magasabb értékek.

	K1			K2 (S)			H1(S)			H2		
Tojók (bélsár ng/ 1g)				Megemelkedett T szint (+16%)			Megemelkedett T szint (+11,8% a H2 csoporthoz viszonyítva)			Magasabb alapérték (+13,8% a K1 csoporthoz viszonyítva)		
Tojás-szik (ng/ 1g)	♀		♂	♀		♂	♀		♂	♀		♂
	104,51± 17,41	< p<0.05	138,28± 38,86	125,79± 49,03	< p<0.05	180,57± 87,75	121,64± 44,05	< p<0.05	200,19± 94,45	106,83± 10,30	< p<0.05	155,72± 32,50
			p<0.05						p<0.05			
4 hetes utódok (ng/ 1ml)	♀		♂	♀		♂	♀		♂	♀		♂
	0,24± 0,08	< p<0.05	0,33± 0,08	0,26± 0,10	< p<0.05	0,41± 0,10	0,28± 0,14	< p<0.05	0,45± 0,08	0,26± 0,08	< p<0.05	0,36± 0,07
				p<0.05							p<0.05	

4.5.1.2.3. Dehidro-epiandroszteron koncentráció eredmények

A másik androgénnél, a *DHEA* (*44. ábra*) esetében a tojóknál közepes mértékű (K2:12%-os ill. H1:19,3%-os) emelkedést tapasztaltunk. A H2 csoportban 6,9%-kal magasabb alapértéket mértünk a K1-es tojókhoz képest.



	terület	%		terület	%
K1	363,665	100, 0	H1	458,875	126,2
K2	407,395	112,0	H2	388,645	106,9

44. ábra Bélsár DHEA koncentrációk az F1 generáció a négy csoportjának tojóinál
Handling stressz hatására megemelkedett a fekális DHEA tartalom.

A handling stressz hatására csoportok közt nem találtunk különbséget, azonban ivari különbség minden csoportban felfedezhető, azaz a hím embriókat tartalmazó tojásokban mindig szignifikánsan magasabb a DHEA szint. A juvenilis állatoknál (F2) is a szikhez hasonló eredményt kaptunk, azaz a hímutódoknál minden esetben magasabb a DHEA hormonszint (*38. táblázat*).

38. táblázat DHEA koncentrációk alakulása a handling stressz kezelés után
A bélsárban detektált DHEA emelkedés megjelenik a szikben is. Minden esetben a hímivarú embriót tartalmazó tojások szikanyagában, valamint a 4 hetes fiatal madaraknál is szignifikánsan magasabb értékeket mértünk.

	K1			K2 (S)			H1(S)			H2		
Tojók (bélsár ng/ 1g)				Megemelkedett DHEA szint (+12%)			Megemelkedett DHEA szint (+19,3% a H2-hoz)			Magasabb alapérték, mint a K1 csoportban (+6,9%)		
Tojás-szik (ng/ 1g)	♀		♂	♀		♂	♀		♂	♀		♂
	12,47± 4,34	< p<0.05	22,93± 15,45	12,88± 4,09	< p<0.05	18,50± 6,72	13,14± 3,88	< p<0.05	20,72± 5,19	14,37± 5,60	< p=0.05	19,79± 5,63
4 hetes utódok (ng/ 1ml)	♀		♂	♀		♂	♀		♂	♀		♂
	0,22± 0,06	< p<0.05	0,26± 0,05	0,20± 0,04	< p<0.05	0,28± 0,06	0,23± 0,07	< p<0.05	0,29± 0,05	0,23± 0,04	< p<0.05	0,29± 0,06

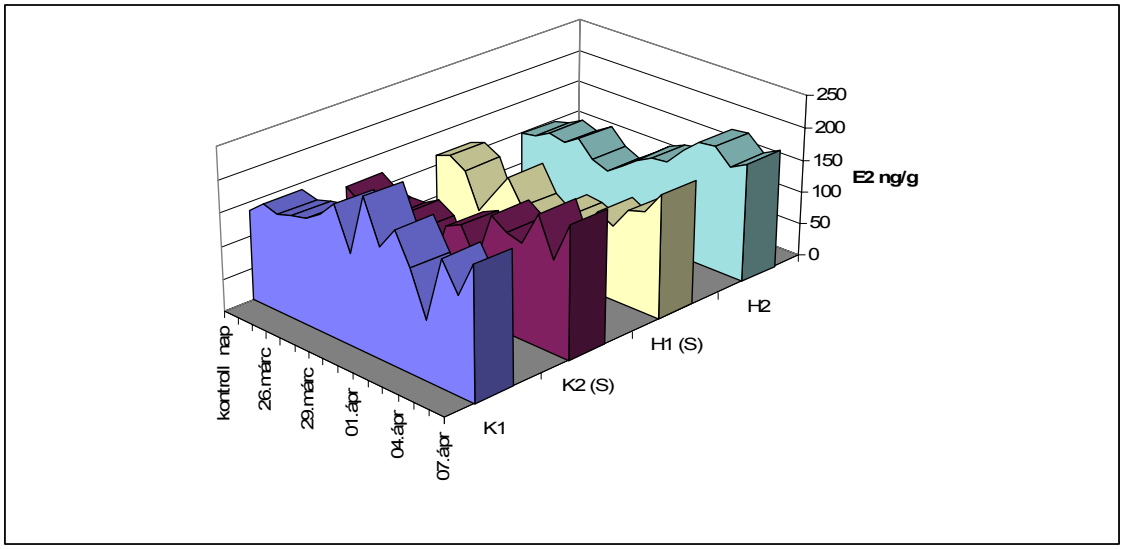
4.5.1.2.4. 17-β-ösztradiol koncentráció eredmények

A fekális *E2 koncentráció* a kezelt csoportokban mindvégig elmaradt a kontrollokhoz képest (*45. ábra*). A K2 csoportnál -az előző évi handling stresszhez hasonlóan- szinte értékre azonosan 25,2%-kal csökkent a szumma E2-produkció, a H1 csoportnál ez a csökkenés mérsékeltebb: 14,45%-kal volt alacsonyabb a hormon koncentráció. A korábban már említett egy tojóra vetített tojásszám is jól tükrözi az össz-E2 termelést, hiszen a legmagasabb érték mindkét paraméternél a K1 csoportban volt (*39. táblázat*).

39. táblázat A bélsárból kimutatható E2 tartalom százalékos kifejezése valamint az egy tojóra jutó tojás darabszám összevetése csoportonként

A fekális E2 tartalom csökkenésével párhuzamosan csökkent egy tojóra jutó tojás darabszáma is.

CSOPORTOK	***K1***	***K2***	***H1***	***H2***
Fekális E2-tartalom terület (%)	100%	74,78%	65,78%	80,23%
Tojás db/ 1 tojó	10,67	5,93	7,00	8,00



	terület	%		terület	%
K1	2504,32	100,00	H1	1647,39	65,78
K2	1872,735	74,78	H2	2009,26	80,23

45. ábra Bélsár E2 koncentrációk az F1 generáció a 4 csoportjának tojóinál

A handling stressz hatására a fekális E2 tartalom csökkent.

A szikben mérhető E2 tartalom tekintetében most nem találtunk szignifikáns különbséget a csoportok közt. A K1 csoportban a hímembriót tartalmazó tojásokban statisztikailag igazolhatóan magasabb koncentrációt mértünk (*40. táblázat*).

40. táblázat Az E2 koncentrációk alakulása a handling stresszkezelés után

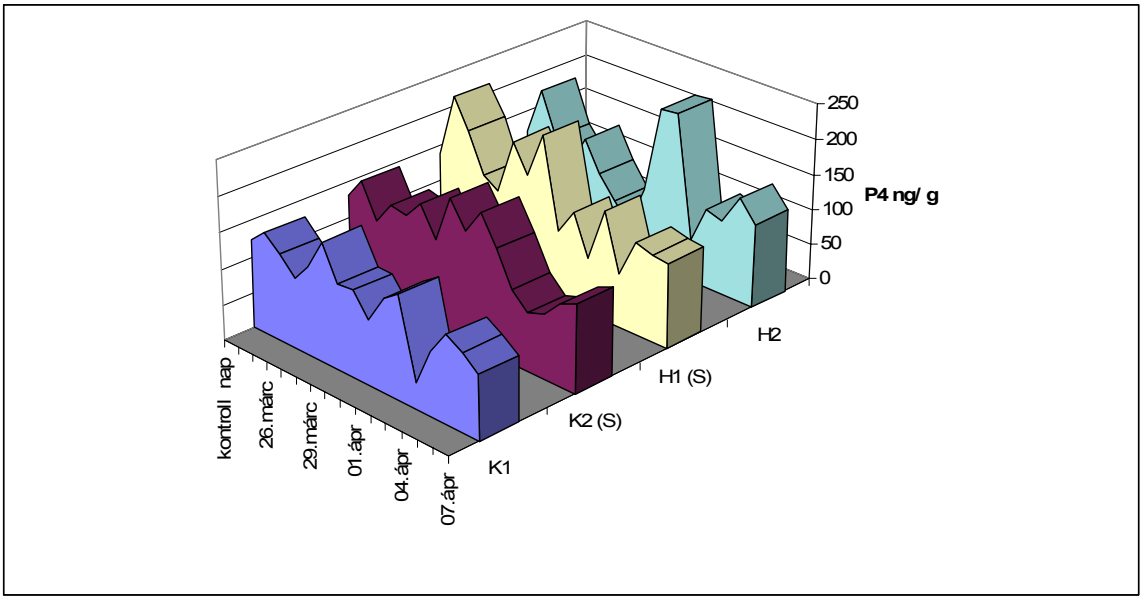
Handling stressz hatására fekális E2 tartalom csökken, azonban szikben ez nem igazolható. A 4 hetes utódoknál a vérplazmában mindig a nőivarban magasabb az E2 szint.

	K1			K2 (S)			H1(S)			H2		
Tojók (bélsár ng/ 1g)				Csökkent E2 koncentráció (-25%)			Csökkent E2 szint (-15% H2-hoz viszonyítva)			Alacsonyabb alapérték (-19,7%) a K1 csoporthoz képest		
Tojás-szik (ng/ 1g)	♀		♂	♀		♂	♀		♂	♀		♂
	16,64± 10,18	< p<0.05	23,97± 10,13	20,69± 13,74	NS	21,60± 16,89	24,50± 14,59	NS	17,49± 10,53	19,55± 10,23	NS	24,42± 5,59
4 hetes utódok (ng/ 1ml)	♀		♂	♀		♂	♀		♂	♀		♂
	0,48± 0,11	> p<0,05	0,21± 0,08	0,52± 0,10	> p<0,05	0,24± 0,09	0,56± 0,12	> p<0,05	0,28± 0,07	0,51± 0,10	> p<0,05	0,25± 0,06

A fiatal kiskacsáknál (F2) a csoportok közt nem találtunk különbséget a plazma E2 koncentrációi között, azonban nem meglepő módon a nőivarnál szignifikánsan magasabb hormonszint volt mérhető (*40. táblázat*).

4.5.1.2.5. Progeszteron koncentráció eredmények

A P4 (*46. ábra*) esetében a kezelés hatására mind a K2 mind a H1 csoportokban egy 18% körüli emelkedés volt megfigyelhető.



	terület	%		terület	%
K1	1722,22	100	H1	2175,6	126,3
K2	2039,195	118,4	H2	1872,1	108,7

46. ábra Bélsár P4 koncentrációk az F1 generáció a 4 csoportjának tojóinál

Handling stressz hatására nőtt a bélsár P4 tartalma.

Sem a szikmintákban, sem a juvenilis állatok (F2) vérplazmájában nem volt kimutatható különbség a csoportok, illetve ivarok között a P4 koncentrációit illetően (*41. táblázat*).

41. táblázat A P4 koncentrációk alakulása a handling stresszkezelés után
A handling kezelések sem a szikben, sem pedig a juvenilis madaraknál nem okoztak koncentrációbeli különbséget.

	K1			K2 (S)			H1(S)			H2		
Tojók (bélsár ng/ 1g)				Emelkedett P4 koncentráció (+18,4%)			Emelkedett P4 koncentráció (+17,6 % a H2 csoporthoz viszonyítva)			Emelkedett fekális P4 alapérték (+8,7%) K1 csoporthoz képest		
Tojás-szik (ng/ 1g)	♀		♂	♀		♂	♀		♂	♀		♂
	9,11± 6,35	NS	12,99± 6,32	12,04± 11,29	NS	12,66± 11,49	10,94± 6,86	NS	14,03± 7,28	8,95± 6,14	NS	13,49± 6,17
4 hetes utódok (ng/ 1ml)	♀		♂	♀		♂	♀		♂	♀		♂
	0,16± 0,05	NS	0,17± 0,03	0,14± 0,08	NS	0,17± 0,05	0,19± 0,06	NS	0,18± 0,04	0,15± 0,04	NS	0,16± 0,06

Összefoglalva a handling stressz hatása az F1 generáció *a hímivarú embriót* tartalmazó tojásaiban:

-Kortikoszteron koncentráció emelkedés (↑) K2

A handling stressz hatása az F1 generáció *a nőivarú embriót* tartalmazó tojásaiban:

- Kortikoszteron koncentráció emelkedés (↑) K2, H1

- Tesztoszteron koncentráció emelkedés (↑) K2, H1

A szekunder ivararány következőképpen alakult a csoportokban:

K1: 55%♀ és 45% ♂ (n=120)

K2(S): 43%♀ és 57% ♂ (n=58)

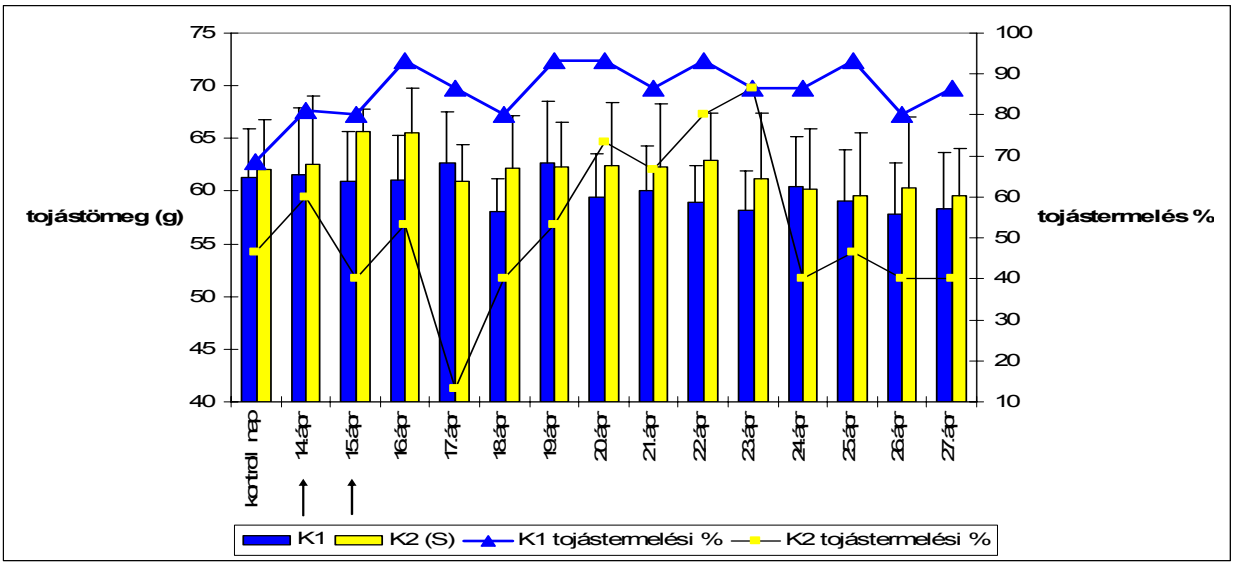
H1(S): 47%♀ és 53% ♂ (n=66)

H2: 51%♀ és 49% ♂ (n=80)

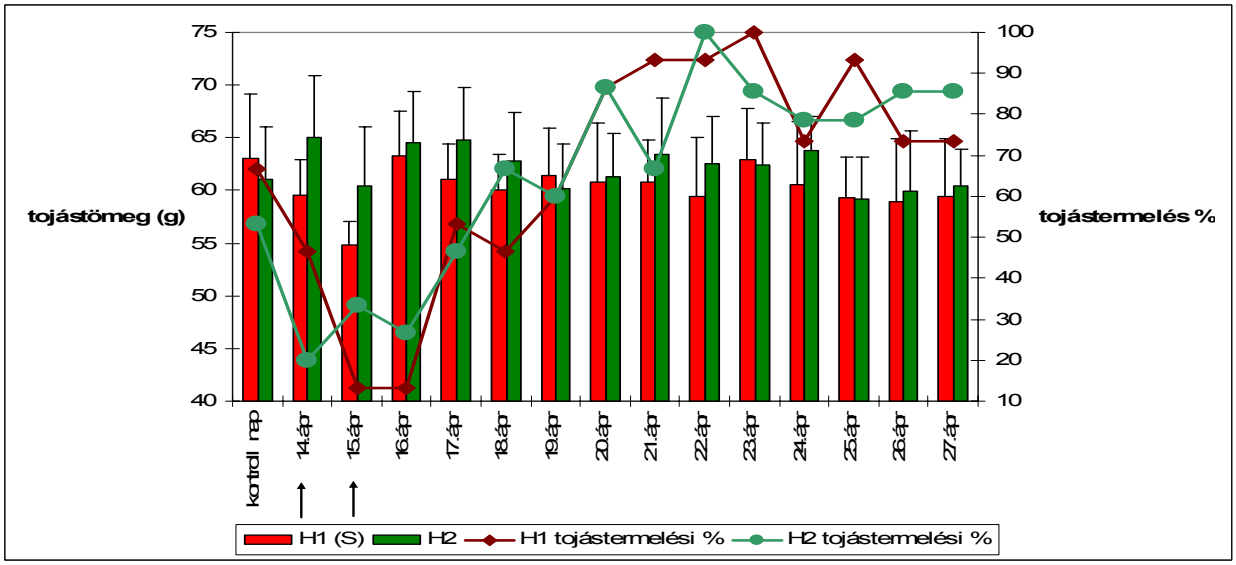
A handling stressz hatására a kikelt fiókák ivareloszlása megváltozott, kismértékben a hímivar irányába tolódott el.

4.5.2. Éter inhalációs stressz vizsgálatok az F1 generáción

Az éter inhalációt követően a K2(S) csoportban tojástermelés visszaesését figyelhetjük meg különösen az első kezelést követő 4.-5 napig (*47. ábra*), ezzel párhuzamosan emelkedik a tojástömeg (*42. táblázat*). A másik kombinációnál (*48. ábra*), ahol már a szülők is kezelt madarak voltak, ott a további stresszkezelés hatására egy rövididejű 2 napig tartó tojásprodukció visszaesést rögzítettünk, majd ez a hatás kompenzálódik, ezt bizonyítja az egyforma tojásszám/ tojó mutató is (H1: 9,93 db tojás/tojó-H2: 9,47 db tojás/tojó).



47. ábra Tojástermelés és tojástömeg alakulása a K1-K2(S) csoportokban az éter-stressz során
A *nyíllal (↑) megjelölt időpontokban történtek a kezelések, az első kezelést követő 5. napig csökkent tojástermelést figyelhetünk meg, ezzel párhuzamosan tojásméret növekedést rögzítettünk.*



48. ábra Tojástermelés és tojástömeg alakulása a H1(S)-H2 csoportokban az éter-stressz során
A nyíllal (↑) megjelölt időpontokban történt a két kezelés, az első kezelést követő 2. napig csökkent tojástermelést figyelhetünk meg, ezzel párhuzamosan tojásméret csökkenést (!) rögzítettünk.

42. táblázat Tojástömeg alakulása az éter inhalációs kísérlet során

Stresszkezelés hatására a K2 csoportban nőtt az átlagos tojástömeg és az egy tojóra jutó tojásszám is itt a legalacsonyabb, a H1 csoportban tojástömeg csökkenést (!) indukált, és a tojásszámban nem volt különbség

Tojástömeg (gramm)	**K1**	**K2 (S)**	**H1 (S)**	**H2**
kontroll nap	61,26±4,69	62,06±4,69	63,09±6,05	61,00±5,03
1. stressz nap	61,59±6,36	62,60±6,36	59,56±3,42	65,07±5,76
2. stressz nap	60,88±4,81	65,62±2,12	54,80±2,26	60,38±5,61
3. nap	61,03±4,20	65,50±4,31	63,30±4,21	64,53±4,85
4. nap	62,70±4,85	60,89±3,50	61,10±3,29	64,80±4,95
5.nap	58,09±3,12	62,19±5,02	60,00±3,45	62,75±4,64
6. nap	62,66±5,82	62,29±4,30	61,45±4,45	60,15±4,26
7.nap	59,43±4,18	62,47±5,87	60,75±5,63	61,26±4,15
8.nap	60,10±4,21	62,34±5,97	60,85±3,89	63,43±5,37
9. nap	58,92±3,45	62,95±4,47	59,48±5,53	62,60±4,39
10.nap	58,21±3,68	61,17±6,21	62,87±4,93	62,44±4,00
11. nap	60,42±4,72	60,23±5,72	60,60±5,96	63,78±3,29
12. nap	59,06±4,82	59,60±5,96	59,36±3,84	59,13±4,09
13. nap	57,83±4,80	60,34±6,63	58,92±6,05	59,95±5,65
14. nap	58,25±5,44	59,50±4,49	59,45±5,52	60,48±3,38
Szumma tojástömeg	**60,64±4,81** n=193	**62,27±4,58** n=113	**59,76±4,70** n=149	**61,35±5,29** n=142
Medián	60,4	62,4	59	61,25
Tojás db/ tojó	*13*	*7,53*	*9,93*	*9,47*
Szignifikancia (ANOVA)	**K1- K2 (S)**	**H1 (S)- H2**	**K2 (S)- H1 (S)**	**K1-H2**
kontroll nap	NS	NS	NS	NS
1. stressz nap	NS	NS	NS	NS
2. stressz nap	NS	NS	NS	NS
3. nap	P=0.01	NS	P=0.04	NS
4. nap	P=0.04	NS	NS	NS
5.nap	NS	NS	NS	NS
6. nap	NS	P=0.05	NS	NS
7.nap	NS	NS	NS	NS
8.nap	NS	NS	NS	NS
9. nap	NS	NS	P=0.05	NS
10.nap	NS	P=0.01	NS	NS
11. nap	NS	NS	P=0.008	NS
12. nap	NS	NS	NS	NS
13. nap	NS	NS	NS	NS
14. nap	NS	NS	NS	NS
Szumma tojástömeg	P=0,004	P=0,007	P=0.00002	NS

A K1 és K2 (S) csoport összehasonlításában az éter stressz hatására szignifikánsan emelkedett tojástömeg a K2 csoportban. E két csoport közt most is markánsabbnak tűnik a tojástermelés visszaesése (13,00 db tojás/tojó: 7,53 db tojás/tojó) – a H1-H2 csoportokhoz képest.
A H1 és H2 összevetésénél meglepő módon, -az eddigiekkel teljesen ellentétesen- a kezelés nem emelte, hanem szignifikánsan csökkentette a tojástömegeket (*42. táblázat*).

4.5.2.1. Az éter stressz hatása az F2 generáció embrionális fejlődésre

Az éter stressz hatására a K2 csoportban közel 5-szörösére nőtt a korai embrió elhalás mértéke a K1 csoporthoz képest, míg a H1 csoportban alig kétszeres ez az emelkedés a H2 csoporthoz hasonlítva. A két kontroll csoport összehasonlításánál a H2 csoportban megduplázódott a korai embrióelhalás az abszolút kontroll (K1) csoporthoz képest. A II. lámpázáskor kiesett tojások aránya mind a négy csoportban közel azonosan alakult, mindenhol alacsony értéket mutatott. A befulladás értéke a K1 csoport tojásainak kivételével magas. Ezt a magas értéket nem lehet keltetési hibának felróni, mivel egy keltetőgépen voltak a tojások. Összefoglalva, az éter stressz a K2 csoportban mintegy 35 százalékkal csökkentette a kelési sikert, ezzel szemben a H1 csoportnál csak 9 százalékos volt ez csökkenés a saját kontrolljához képest, de az abszolút kontrollhoz képest ez 30% (*43. táblázat*).
Ennél a vizsgálatnál csak a K2-es fiókák tömeges kelése következett be mintegy 12 órával korábban.

43. táblázat A kelés alakulása az F1 generáció 4 csoportjában az éter stressz vizsgálatokban
A handling stressz mintegy 10-35%-kal csökkentette a kelés eredményességét a különbség a korai elhalásból adódott.

	K1	*K2 (S)*	*H1 (S)*	*H2*
I. lámpázáskor kiesett (10. nap)	6,76%	33,33%	24,32%	13,04%
II. lámpázáskor kiesett (25. nap)	5,40%%	8,33%	8,11%	8,69%
Befulladás	6,76%	12,50%	16,33%	17,39%
Kelési%	**81,08%**	**45,84%**	**51,35%**	**60,88%**

A szikanalízis vizsgálatokra 84 óra hosszat inkubált tojásokban is megfigyelhető az előbb említett tendencia, mely szerint a kezelt csoportokban megnőtt az elhalt, az abnormális és az átlagosnál kisebb embriók aránya (*44. táblázat).*

44. táblázat Az embriók fejlettsége 84 órás inkubáció után
A K2 csoportban 20%-kal, a H1 csoportban 35%-kal csökkent az élő, normális fejlődést mutató embriók aránya.

	K1	**K2 (S)**	**H1 (S)**	**H2**
0: elhalt embrió	4,5 %	16,7%	22,9%	5%
1: abnormális embrió	6,8 %	10%	17,1%	-
2: élő, de átlagnál kisebb	15,9%	20%	20%	20%
3: élő, normál embrió	70,5%	50%	34,3%	70%
BWE (Blastoderm without embryo)	-	-	-	2,5%
PD (positive development)	-	-	-	-
terméketlen	2,3 %	3,3%	5,7%	2,5%
Vizsgált tojásszám	44 db	30 db	35 db	40 db

A testtömeg tekintetében sehol sem találtunk szignifikáns különbséget (*45. táblázat*).

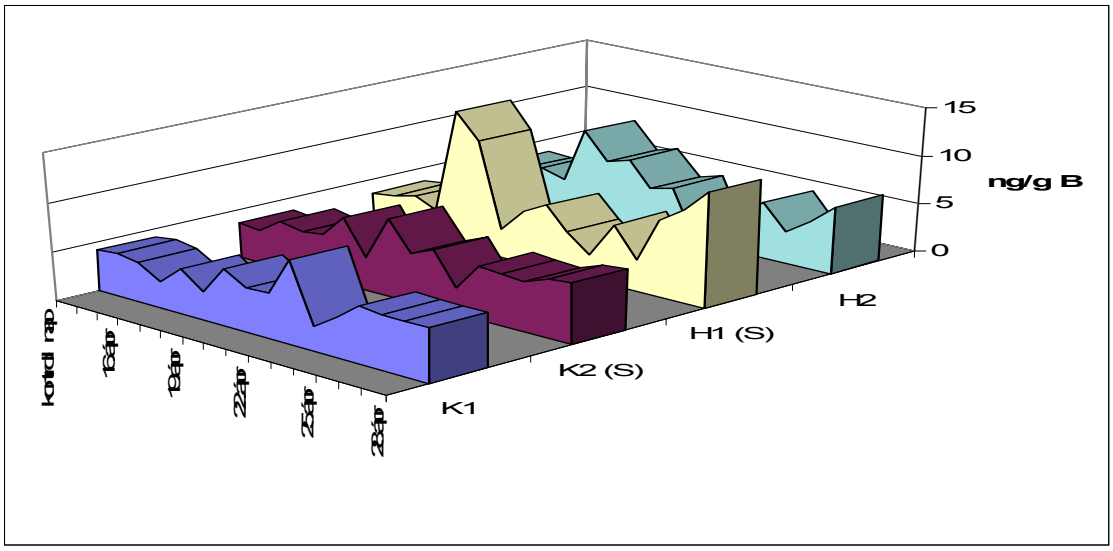
45. táblázat Az F2 nemzedék testtömeg alakulása az éter stressz vizsgálatokban
Éter stressz hatására nem található testtömegbeli különbség.

Testtömeg alakulása (g)	*Napos*	*1 hetes*	*2 hetes*	*4 hetes*
K1	34,75±4,49	110,11±10,95	272,32±24,67	599,28±72,84
K2 (S)	34,40±3,71	117,83±16,69	270,45±19,25	583,74±76,23
H1 (S)	32,41±3,17	113,29±14,73	267,14±23,98	577,32±67,52
H2	33,24±3,60	117,60±19,93	251,79±18,77	561,83±61,75

4.5.2.2 Szteroid vizsgálatok

4.5.2.2.1. Kortikoszteron koncentráció eredmények

Az éter inhalációs stressz után a tojóknál megnőtt a bélsárban mérhető kortikoszteron koncentráció (*49. ábra*), a görbe alatti területszámítással: a K2(S) csoportnál 8,8 %-kal magasabb ez az érték, míg a H1(S) csoport fekális koncentrációi 34,8 %-kal mutatnak jóval magasabb szintet a teljes vizsgálati periódus alatt. A két kontroll csoport (K1 és H2) kortikoszteron alapértéke megegyezett.



	terület	%		terület	%
K1	70,34	100	H1	93,94	133,6
K2	76,5	108,8	H2	69,52	98,8

49. ábra Fekális kortikoszteron koncentrációk az F1 generációs éter stressz vizsgálatokban
Éter stressz hatására nőtt a bélsár kortikoszteron tartalma (K2: +9%, H1: 35%)

A stresszelt csoportoknál a tojásszikben is detektálható szignifikáns B emelkedés mind a nőivarú-, mind a hímivarú embriót tartalmazó tojások szikanyagát tekintve. A 4 hetes F2 utódoknál a csoportok közt nem volt statisztikailag értékelhető különbség, azonban minden csoport hímivarú utódainál –a nőivarúakhoz képest- szignifikánsan magasabb értékeket találtunk (*46. táblázat*).

46. táblázat Kortikoszteron koncentrációk alakulása az éter stresszkezelés után az F1 generáció négy csoportjában
A bélsárban detektált megnövekedett B tartalom megjelenik a tojásszikben is, a négy hetes utódoknál a csoportok közt nincs szignifikáns különbség, azonban a fiatal gácsérokban mindig magasabb koncentrációt mértünk.

	K1			K2 (S)			H1(S)			H2		
Tojók (bélsár ng/ 1g)				Megemelkedett B szint (+8,8%)			Megemelkedett B szint (+34,8%)			Közel azonos B szint (-1,2%) a K1 csoporthoz képest		
Tojásszik (ng/ 1g)	♀		♂	♀		♂	♀		♂	♀		♂
	1,29± 0,50	NS	1,41± 0,64	2,36± 0,39	NS	2,61± 0,48	2,21± 0,89	NS	2,40± 0,65	1,43± 0,45	NS	1,64± 0,52
		p<0.01			p<0.01			p<0.01			p<0.01	
4 hetes utódok (ng/ 1ml)	♀		♂	♀		♂	♀		♂	♀		♂
	0,69± 0,11	< p<0.01	1,14± 0,32	0,80± 0,24	< p<0.05	1,28± 0,41	0,77± 0,31	< p<0.05	1,32± 0,44	0,81± 0,27	< p<0.05	1,40± 0,48

A következő két (*47-48.*) táblázatban a 84 órás inkubáció utáni embriófejlettség, szik-kortikoszteron koncentrációk valamint a tojástömeg összefüggéseit mutatjuk be a K- és a H csoportokban.

47. táblázat Az embrióstátusz a kortikoszteron koncentráció és a tojástömeg összefüggései a handling stresszt követően a K1 és K2 (S) csoportokban
Az elhalt embriót tartalmazó tojásszikből magas B szint volt kimutatható mindkét csoportban, valamint függetlenül a kezeléstől tojástömeg-növekedéssel párosult. Az élő, normál fejlődésű embriót tartalmazó tojások az alacsony B szintben megegyeztek, azonban a kezelt csoportban a tojásméret magasabb volt.

		0: elhalt embrió	1: abnormális embrió	2: élő, de átlagnál kisebb	3: élő, normál embrió
B konc ng/g	K1	2,21±0,60	1,39±0,41	1,24±0,27	1,06±0,31
	szignifikancia	NS	p=0.02	p=0.02	NS
	K2 (S)	2,82±0,73	2,30±0,57	1,92±0,63	1,89±0,32
Tojástömeg (g)	K1	61,9±5,27	58,31±4,43	60,11±4,43	60,09±4,16
	szignifikancia	NS	P=0.04	p=0.04	p=0.03
	K2 (S)	62,50±6,33	62,48±6,60	61,31±3,47	61,98±4,11

A kísérlet ezen része megfelel az előző évi éter stressz vizsgálat ismétlésének (*47. táblázat*). Tendencia itt is hasonló: az elhalt embriót tartalmazó tojásszikből mindkét csoportban magas glükokortikoid szint volt kimutatható. Ezenkívül a magas koncentráció mind a kontroll, mind a kezelt csoport tojásainál tojástömeg-növekedéssel párosult. Az abnormális embriókat tartalmazó tojások esetében itt is a K1 (abszolút kontroll) csoportban alacsony, míg a kezelt csoportban magasabb B értékeket kaptunk, amely statisztikailag is igazolható. Az élő, de az átlagnál kisebb embriókat tartalmazó tojásoknál a kontroll csoportban szignifikánsan kisebb B koncentrációk mérhetők, valamint kisebb tojástömegek is. Az élő, normál embriót tartalmazó tojásoknál - ellentétben az eddigi eredményekkel-a kezelt K2-es csoportnál mind a szik-kortikoszteron, mind pedig a tojástömeg is magasabb értéket mutatott.

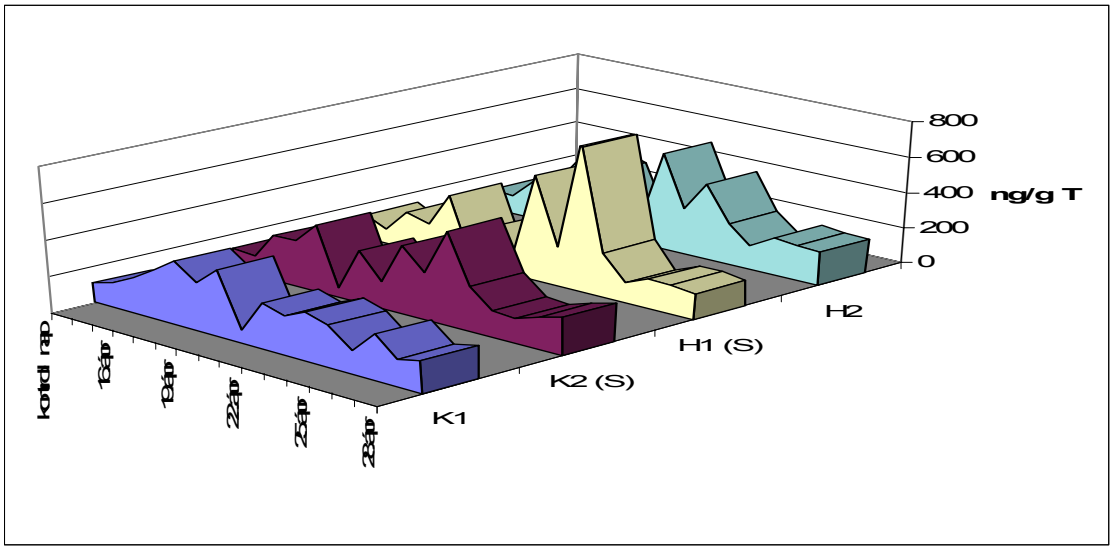
48. táblázat Az embrióstátusz a kortikoszteron koncentráció és a tojástömeg összefüggései az éter stresszt követően a H2 és H1 (S) csoportokban
Az elhalt embriót tartalmazó tojásszikből magas B szint volt kimutatható mindkét csoportban és függetlenül a kezeléstől mindig tojástömeg-növekedéssel párosult. Az élő, normál fejlődésű embriót tartalmazó tojások esetében is magasabb B koncentráció mérhető a stressz hatására, a tojástömegben pedig csökkenést(!) eredményezett.

		0: elhalt embrió	1: abnormális embrió	2: élő, de átlagnál kisebb	3: élő, normál embrió
B konc ng/g	H2	2,12±0,65	1,66±0,55	1,37±0,31	1,28±0,35
	szignifikancia	NS	P<0.01	P<0.01	P<0.0.1
	H1 (S)	2,70±0,79	2,61±0,41	2,39±0,76	1,85±0,44
Tojástömeg (g)	H2	62,11±7,03	62,25±10,10	60,22±6,13	61,28±4,18
	szignifikancia	NS	NS	NS	P=0.04
	H1 (S)	61,85±4,77	60,33±6,77	59,27±7,66	58,95±5,19

Eddig minden kísérlet megegyezett az elhalt embriókat tartalmazó tojások paramétereiben, azaz a magas B szint párosult a tojástömeg átlagának növekedésével, függetlenül a kezeléstől. Ennél a kombinációnál, ahol minden szülő a kezelt tojók utódaiból került ki, az ismételt kezelés a szikben mindenhol magasabb értéket mutat, míg a tojásméretben épp ellenkezőleg az élő, normál fejlettségű embrió csoportnál találtunk különbséget és ott is meglepő módon csökkenést (*48. táblázat*).

4.5.2.2.2. Tesztoszteron koncentráció eredmények

A fekális tesztoszteron ekvivalens mennyiségét tekintve az éter stressz hatására mérsékeltebb koncentráció emelkedéseket mértünk.



	terület	%		terület	%
K1	3334,3	100,0	H1	3710,7	111,3
K2	3506,7	105,2	H2	3622,4	108,6

50. ábra Fekális tesztoszteron koncentrációk az F1 generációs éter stressz vizsgálatokban
Éter-stressz hatására kismértékben nőtt a bélsárban detektálható T ekvivalens mennyisége mindkét stresszelt csoportban

K2-nél 5,2%-os, a H1 tojóinál csak 2,7%-os emelkedés volt mérhető (*50. ábra*). A maternális handling stressz kezelést kapó H2-es csoport T alapértéke 8,6 %-kal magasabb, mint az abszolút kontroll (K1) csoporté. Ennél a kezelésnél nem volt számottevő eltérés a fiókák kelési időpontjai között.

49. táblázat Tesztoszteron koncentrációk alakulása az éter stressz kezelés után

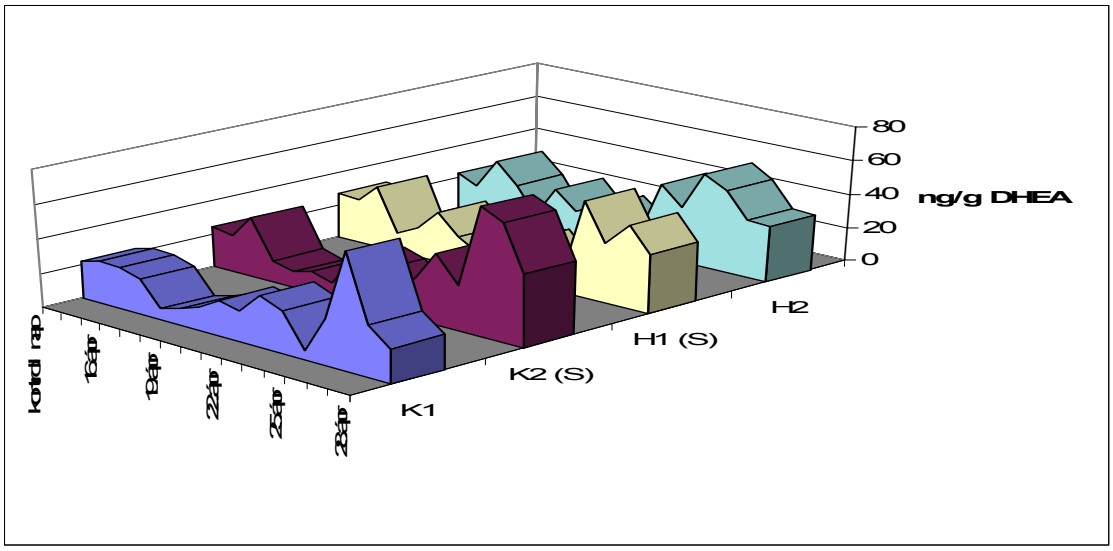
A bélsárban megemelkedett T szint csak részben igazolható a tojásszikben a K csoportoknál a hímivarú embriót tartalmazó tojásokban, míg a H-csoportoknál a nőivarú embriót tartalmazó tojásoknál található magasabb koncentráció. A 4 hetes gácsérok plazma T tartalma minden esetben magasabb volt.

	K1			K2 (S)			H1(S)			H2		
Tojók (bélsár ng/ 1g)				Megemelkedett T szint (+5,2%)			A H2 kontrollhoz képest kismértékben megemelkedett T szint (+2,7%) K1-hez képest: (11,3%)			Magasabb alapérték a K1 csoporthoz viszonyítva (+8,6%)		
Tojás-szik (ng/ 1g)	♀		♂	♀		♂	♀		♂	♀		♂
	70,67± 9,48	NS	71,58± 10,48	81,21± 19,25	NS	87,48± 10,07	91,64± 14,08	NS	94,22± 19,59	75,23± 10,35	NS	77,67± 11,00
				p<0.05				p<0.05				
4 hetes utódok (ng/ 1ml)	♀		♂	♀		♂	♀		♂	♀		♂
	0,25± 0,08	< p<0.05	0,34± 0,10	0,25± 0,10	< p<0.05	0,36± 0,11	0,26± 0,14	< p<0.05	0,40± 0,08	0,24± 0,08	< p<0.05	0,38± 0,07

A tojóknál mért T koncentráció emelkedés megjelenik a szikbe deponált szteroidok koncentrációjában is. A K1-K2 vizsgálatnál, csak a hímivarú embriót tartalmazó tojásoknál tudtuk statisztikailag is igazolható különbséget kimutatni. A H1-H2 vizsgálatnál pedig ellentétesen épp a nőivarnál mértünk magasabb T szintet. A szikmintákban nem tudtunk ivari különbséget kimutatni. A 4 hetes utódok (F2) vérplazmájából mind a négy csoportban ivari különbséget detektáltunk, azaz a hímeknél mindig magasabb T érték volt mérhető (*49. táblázat*).

4.5.2.2.3. Dehidro-epiandroszteron koncentráció eredmények

A másik androgénnél, a *DHEA* (*51. ábra*) esetében a K2-es tojóknál 24%-os emelkedést, míg a Hl-H2 csoportoknál azonosan alakultak a koncentrációk. A H2-es kontroll csoportban 13,3 %-kal magasabb értéket mértünk az abszolút kontroll csoporthoz (K1) viszonyítva.



	terület	%		terület	%
K1	345,1	100	H1	388,2	112,5
K2	428,2	124,1	H2	390,9	113,3

51. ábra Fekális dehidro-epiandroszteron koncentrációk az F1 generációs éter stressz vizsgálatokban

Éter-stressz hatására a K2(S) csoportban nőtt a bélsárban detektálható T ekvivalens mennyisége, míg a H1 csoportokban megegyezett a két érték.

A kezelés hatására csoportok közt nem találtunk szignifikáns különbséget, azonban ivari különbség minden csoportban felfedezhető, azaz a hím embriókat tartalmazó tojásokban mindig szignifikánsan magasabb a DHEA szintje. A juvenilis állatok (F2) vérplazma vizsgálatai is a szikhez hasonló eredményt adtak, azaz a hímutódoknál minden esetben magasabb a hormonszint (*50. táblázat*).

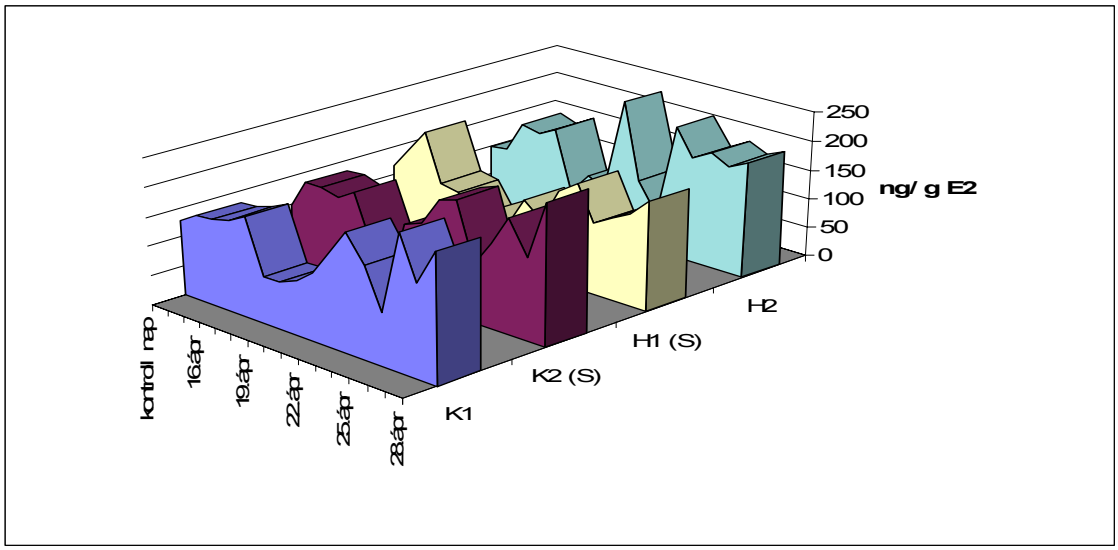
50. táblázat DHEA koncentrációk alakulása az éter stressz kezelés után

A tojóknál a bélsárban megemelkedett DHEA koncentrációt nem tudtuk igazolni a tojásszikben, azonban a hímivarú embriót tartalmazó tojásokban kivétel nélkül magasabb szintet mértünk, ugyanezt találtuk a vérplazmában is.

	K1			K2 (S)			H1(S)			H2		
Tojók (bélsár ng/ 1g)				Megemelkedett DHEA szint (+24,1%)			A H2 kontrollhoz képest azonos DHEA szint (-0,8%) Emelkedett DHEA szint (+12,5%) a K1-hez képest			Magasabb alapérték, mint a K1 csoportban (+13,3%)		
Tojás-szik (ng/ 1g)	♀		♂	♀		♂	♀		♂	♀		♂
	13,42± 6,45	< p<0.01	25,20± 3,42	10,50± 7,59	< p<0.05	27,45± 6,39	12,78± 4,.24	< p<0.05	23,72± 5,19	14,37± 5,60	< p=0.05	24,25± 5,13
4 hetes utódok (ng/ 1ml)	♀		♂	♀		♂	♀		♂	♀		♂
	0,23± 0,05	< p<0.05	0,27± 0,03	0,20± 0,04	< p<0.05	0,29± 0,07	0,24± 0,05	< p<0.05	0,30± 0,04	0,21± 0,06	< p<0.05	0,28± 0,05

4.5.2.2.4. 17-β-ösztradiol koncentráció eredmények

A fekális E2 koncentráció a kezelt csoportokban elmaradt a kontrollokhoz képest (*52. ábra*). Bár a csökkenés mértéke, alacsonyabb, mint a korábbi vizsgálatokban. A két kontroll csoport fekális E2 szintje azonosan alakult.



	terület	%		terület	%
K1	2163,68	100,00	H1	1932,38	89,31
K2	2111,53	97,58	H2	2177,93	100,65

52. ábra Fekális 17-β-ösztradiol koncentrációk az F1 generációs éter stressz vizsgálatokban
Éter stressz hatására csökkent a bélsár E2 tartalma a stresszelt csoportokban

A szikben mérhető E2 tartalom tekintetében nem találtunk szignifikáns különbséget a csoportok közt. Az egyedüli kivétel a K1 csoport, ahol a hímembriót tartalmazó tojásokban szignifikánsan magasabb szintet mértünk, mint a nőivarú embriót tartalmazókban (*51. táblázat*).

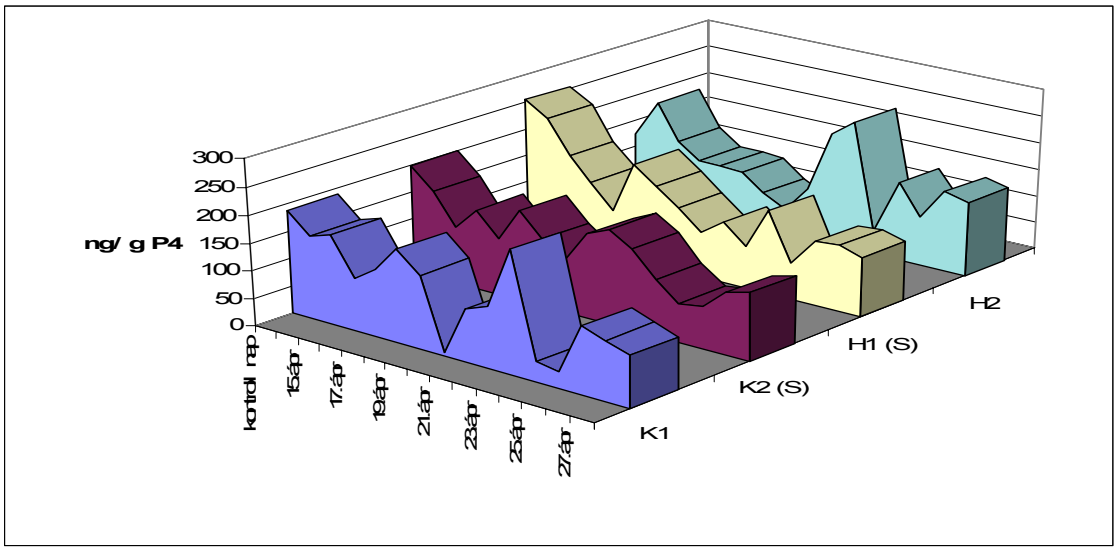
51. táblázat Az E2 koncentrációk alakulása a handling stressz kezelés után
Éter-stressz hatására csökkent a bélsár E2 tartalma, szikben azonban nem indukált változást. Ivari különbséget találtunk K1 csoportbana hímivarú embriót tartalmazó tojásokban volt magasabb szint.

	K1			K2 (S)			H1(S)			H2		
Tojók (bélsár ng/ 1g)				Kissé csökkent E2 koncentráció (-2,5%)			Csökkent E2 szint (-11%)			Megegyező a K1 csoporttal		
Tojás-szik (ng/ 1g)	♀		♂	♀		♂	♀		♂	♀		♂
	18,64± 4,18	< p<0.05	26,76± 1,82	25,16± 4,18	NS	30,59± 8,77	20,25± 7,25	NS	23,07± 9,53	19,44± 8,22	NS	22,02± 7,78
4 hetes utódok (ng/ 1ml)	♀		♂	♀		♂	♀		♂	♀		♂
	0,44± 0,10	> p<0,05	0,22± 0,08	0,48± 0,11	> p<0,05	0,20± 0,09	0,47± 0,08	> p<0,05	0,25± 0,06	0,40± 0,10	> p<0,05	0,24± 0,06

A kiskacsáknál (F2) a csoportok közt nem találtunk különbséget a plazma E2 koncentrációi között, azonban nem meglepő módon a nőivarnál szignifikánsan magasabb hormon szint volt mérhető (*53. táblázat*).

4.5.2.2.5. Progeszteron koncentráció eredmények

A P4 (*53. ábra*) esetében a kezelés hatására mind a K2 mind a H1 csoportokban 11% ill. 8,7%-os emelkedés volt megfigyelhető. A H2 alapértéke 6,9%-kal magasabb volt, mint az abszolút kontroll (K1) csoporté.



	terület	%		terület	%
K1	1710,49	100,0	H1	1976,69	115,6
K2	1898,77	111,0	H2	1828,15	106,9

53. ábra Fekális progeszteron koncentrációk az F1 generációs éter stressz vizsgálatokban
Éter stressz hatására nőtt a bélsárban detektált P4 ekvivalens mennyisége.

Sem a szikben (*52. táblázat*) sem juvenilis madaraknál (F2) nem találtuk különbséget sem a csoportok, sem pedig az ivarok között a P4 szintben.

52. táblázat P4 koncentrációk alakulása az éter stresszkezelés után az F1 generáció csoportjaiban
A bélsárban megjelent koncentrációemelkedés nem jelent sem a szik, sem pedig a fiatal madarak szintjén.

	K1			K2 (S)			H1(S)			H2		
Tojók (bélsár ng/ 1g)				Emelkedett P4 koncentráció (+11%)			Emelkedett P4 koncentráció (+8,7%)			Emelkedett alapérték a K1 csoporthoz viszonyítva (+6,9%)		
Tojás-szik (ng/ 1g)	♀		♂	♀		♂	♀		♂	♀		♂
	11,11± 7,24	NS	13,36± 6,52	13,74± 10,09	NS	15,60± 11,69	14,04± 8,02	NS	16,37± 7,01	12,15± 5,24	NS	13,76± 6,07
4 hetes utódok (ng/ 1ml)	♀		♂	♀		♂	♀		♂	♀		♂
	0,15± 0,05	NS	0,17± 0,05	0,14± 0,08	NS	0,17± 0,06	0,20± 0,06	NS	0,19± 0,04	0,16± 0,04	NS	0,18± 0,06

Összefoglalva az éter stresz hatása *a hímivarú embriót* tartalmazó tojásokban:

-Kortikoszteron koncentráció emelkedés (↑) K2, H1
-Tesztoszteron koncentráció emelkedés (↑) K2

A kezelés hatása *a nőivarú embriót* tartalmazó tojásokban:

- Kortikoszteron koncentráció emelkedés (↑)K2, H1

- Tesztoszteron koncentráció emelkedés (↑) H1

A szekunder ivararány következőképpen alakult a csoportokban:

K1: 54%♀ és 46% ♂ (n=110)

K2 (S): 45%♀ és 55% ♂ (n=66)

H1 (S): 48%♀ és 52% ♂ (n=75)

H2: 53%♀ és 47% ♂ (n=79)

Az eddigi eredményekkel megegyezően az éter stressz hatására is a kikelt fiókák ivareloszlása megváltozott, bár kismértékben, de a hímivar irányába tolódott el.

4.6. Új tudományos eredmények

1. Igazoltuk, hogy a dietil-éteres extrakció Triton-X-100 emulzifikációval kiegészítve a leghatékonyabb extrakciós módszer mind az intakt tojásból származó, mind az inkubált tojásból származó szikanalízisek esetében, ezzel új tojásszik extrakciós eljárást fejlesztettünk ki.
2. Igazoltuk, hogy a keltetés 4. napjáig következtethetünk eredeti, maternális allokációra tőkés récében szik tesztoszteron és ösztrogén tartalom vonatkozásában, mivel azok szintje csak az 5. naptól mutat ingadozást. A szik kortikoszteron esetében maternális allokációra akár az inkubáció 5.-6. napjáig is következtethetünk.
3. Megállapítottuk, hogy a teljes takarmány-áthaladás ideje szezontól és ivartól független, míg a takarmány-*chimus*-bélsár retenció időtartama ivar- és szezonfüggő. A *chimus*-bélsár áthaladási sebessége ivar- és szezonfüggő, ami a szexuális aktivitás idején minkét ivarban megnövekszik.
4. Megállapítottuk, hogy az endogén tesztoszteron szint jelentősen befolyásolja az *i.p.* beadott szteroid turnoverének alakulását tőkés récében, amely mind a vérplazmában lévő, mind pedig a bélsárban ürített hormontartalom alakulásában kimutatható.
5. Megállapítottuk, hogy mind a handling-stressz, mind az éter inhalációs stressz több ismétlésben és különböző kombinációkban is a bélsárból kimutatható kortikoszteron-, tesztoszteron- és progeszteron-ekvivalens emelkedést indukált.
6. Megállapítottuk, hogy a stressz hatására megnövekedett szik kortikoszteron koncentráció tojásméret növekedéssel, emelkedett embrió elhalással, s így alacsonyabb kelési sikerrel járt. Ezáltal igazolást nyert, hogy a korai embrióelhalások mögött nemcsak genetikai anomáliák állhatnak, hanem befolyásoló hatású lehet a tojómadár által allokált hormonális miliő is.
7. Bizonyítottuk a stressz kezelések hosszútávú hatását, mivel a felnőtt utód generációban is kimutatható hatása volt a fekális T, DHEA koncentráció-alapérték megemelkedésében, az ivarérés eltolódásában és az utódok reprodukciós kapacitásának csökkenésében.
8. Elsőként írtuk le, hogy a DHEA koncentrációja mind a kontroll mind a stresszelt madarak esetében magasabb a hím embriót tartalmazó tojásszikben.
9. Megállapítottuk, hogy a stressz kezelések hatására a szekunder ivararányban kismértékű eltolódás mutatkozik a hímivar javára.

5. KÖVETKEZTETÉSEK ÉS JAVASLATOK

5.1. Metodikai fejlesztés a tojásszik szteroid analízisében

Az irodalmi adatok áttekintése alapján a tojásszikben található szteroidok analízésének extrakciós módszertana kiforrott metodikának tűnt. Azonban e területen született publikációk többsége inkább az alkalmazás eredményeiről számol be, míg a metodika kérdéseiről kevés részletes adatot találni. Az alkalmazók gyakran viselkedés-ökológusok, akik kész módszerként alkalmazzák a néhány módszertani dolgozat eredményeit (Schwabl et al., 1997), vagy szteroid-analitikai laborok végzik el számukra a méréseket, akik a publikáció megírásakor nem fejtik ki a metodika nehézségeit (Gil et al., 1999, Eising et al., 2001, Petrie et al., 2001). Az első, és talán egyetlen metodikai cikket Schwabl (1993) írta. Vizsgálataink alapjául ezt a munkát tekintettük. Célunk mindenekelőtt egy egyszerű, viszonylag olcsó és megbízható módszer kidolgozása volt, mely fajtól és inkubációtól függetlenül pontos eredményt ad. Kísérleteink során összehasonlítottuk a Schwabl-féle direkt petroléter/dietil éteres -, a direkt dietil-éteres extrakciót, egyrészt SDS-es emulzifikációval-, másrészt Triton-X-100-as emulzifikációval kiegészítve. Korábbi fekális szteroid analízissel kapcsolatos metodikai munkánk tanulságai alapján (Kelemen et al., 2003) arra gondoltunk, hogy itt is fokozhatnánk a direkt extrakció hatékonyságát az extrakció előtti detergens kezeléssel. Közismert, hogy a tojásszik fehérje és zsírtartalma nagyon jelentős, szárazanyagra vetítve a szik 60%-a a lipid tartalom (Williams et al., 2001).

Első megközelítésként a bélsár analíziseknél bevált ionos detergenst, a SDS-ot használtuk, de ez nem váltotta be a hozzá fűzött reményeket, így egy nem-ionos detergenssel, a Triton-X-100-zal próbálkoztunk 1%-os koncentrációban. A hígítási sor grafikus ábrázolása során a legkisebb meredeksége (m=-3,84) a dietil-éteres extrakció Triton-X-100-as előkezeléssel kiegészítve eljárásnak volt. Az intakt tojásból származó szikminták extrakciójakor a Triton-X-100 delipidizációs eljárás szignifikánsan javította az extrakciós recovery értékét, tehát esetünkben a tesztoszteron kinyerése a magas lipid tartalmú szikből 69% körüli állandó, stabil értéket mutat. Schwabl, 1993-ban publikált eredményei a T recovery tekintetében 62% körüli értéket mutattak. Tapasztalataink alapján azoknál a tojásoknál, ahol megindult az embriógenezis, ott hígabbá válik a tojássárgája és javul a szteroid kinyerés százalékos aránya is. Feltételezésünk szerint ennek hátterében a megindult zsírmobilizáció állhat, s ennek következtében válik hatékonyabbá a szteroid extrakció. Az embriós tojások esetében nem találtunk statisztikailag is igazolható különbségeket a különböző extrakciós metodikák recovery értékei közt.

Az általunk beállított extrakciós módszerrel már számos – élettanilag reálisnak tűnő és egymással összehasonlítható - eredmény született munkacsoportunkban, különböző madárfajokon.

Domesztikált fajok közül a stressz hatására megváltozott szteroid allokációt találtunk gyöngytyúk- (T, B, E2, DHEA): Biczó et al., 2004, házityúk- (B): Szőke et al., 2005, 2006, és házilúd (B) tojásokban (nem publikált adatok) esetében. Vadmadárfajokon is eredményes analíziseket végeztünk, melyeket a következő publikációk igazolnak: örvös légykapó (T): Michl et al., 2002, 2004, kakukk: Török et al. (T), 2004. Sikeres T és B analíziseket végeztünk dankasirály-, túzok- és vándorsólyom tojásokon (nem publikált eredmények).

A fenti eredmények alapján javasolható, ez az extrakciós módszer Triton-X-100- as előkezeléssel madárfajtól függetlenül, mind az ún. „embriós", keltetett, mind az intakt tojások esetén. A radioimmunoassay előtt, azonban célszerű egy előzetes próba alapján, meghatározni a kiindulási mennyiséget, hiszen a tojásszik méretétől függően változhat a szteroid koncentráció is.

5.2 *Tojás biopszia* vizsgálatok

Korábbi páva kísérletekben 10 napos inkubációt követően a tojásból, polimeráz láncreakció (PCR) segítségével állapították meg az embrió ivarát. A hormonális összefüggések feltárására, párhuzamosan a tojásszikből meghatározták az androgéneket és a 17-β-ösztradiolt is. A hím embriók esetében a tesztoszteron és az androszténdion-, míg hasonló korú nőivarú embrióknál a 17-β-ösztradiol és az 5-α-dihydrotesztoszteron koncentrációja volt magasabb a szikben (Petrie et al, 2001). Ezt az eredményt kissé szkeptikusan fogadtuk, hiszen korábbi ismereteink alapján az ivarmirigyek szteroid termelése már jóval a szöveti differenciálódás előtt kialakul. A gonád-kezdeményekben már az inkubáció második napján, jóval a petefészek és a here szöveti szerkezetének elkülönülése előtt Δ^5-3β-hidroxyszteroid-dehidrogenáz aktivitás mutatható ki. A hatodik napon ösztrogéneket, a nyolc-tíz napos csirkeembrió ivarmirigyeiben pedig androgéneket, ösztrogéneket és progeszteront mutattak ki (Péczely, 1987). Az előző adatok a 21 napos inkubációs idejű házityúkra vonatkoznak, de a páva és kacsa keltetési ideje hosszabb, 28 nap körül alakul, tehát ez azt jelenti hogy legkésőbb már a 3. napon ezeknél a fajoknál is megindulhat a Δ^5-3β-HSD aktivitás.

Vizsgálatainkban arra kerestük a választ, hogy a tőkés réce embrió szteroid termelését, illetve felhasználását az inkubáció hányadik napjától kell figyelembe venni, hogy reális képet nyerjünk a maternális eredetű szteroidok koncentrációjáról. A szik tesztoszteron és ösztrogén koncentráció változásai a 4. napig nem mutatnak radikális változást. Az ösztrogén értékeket tekintve az első 4 napban kissé fluktuáló, de jelentős különbséget nem mutató értékeket kaptunk. Ez a megfigyelésünk megegyezik Elf és munkatársai, 2002-es adataival, akik csirkeembriókat vizsgáltak az inkubáció 20. napjáig az alábbi időpontokban (0., 1., 2., 3., 5.5., 7.5., 9., 12., 14., 20. nap). Fenti szerzők azonban nem ugyanazon embriót követtek nyomon, hanem különböző tojásokat törtek fel az adott napokon

eltérő elemszámban (n=12-36). Az inkubáció első három napján nem történt szignifikáns koncentráció-változás, amely kacsa embriófejlődését tekintve kb. az 1.-4. napnak felel meg, az 5,5. napon pedig kismértékű csökkenést rögzítettek, ez kacsánál kb. 6-7. napnak felel meg, amikor mi hasonló koncentráció csökkenést detektáltuk. Tőkés réce esetében az ötödik napon már erőteljes koncentráció emelkedést figyeltünk meg a nőivarú embriókat tartalmazó tojásokban és hím embriókat tartalmazóknál a 3.-4. napra jellemző értéket mértük.

Tesztoszteron esetében az inkubáció első napja másként alakult, mint az E2-nél, ebben az esetben egy 12 % csökkenést tapasztaltunk és ez a megfigyelésünk is megegyezett Elf és munkatársai, 2002-es adataival. Ők is szignifikáns csökkenést detektáltak csirke embrióknál az első napon, ez az érték az ő vizsgálataikban a 3. napig nem változott. Tőkés réce esetében a 2. napra visszatért az eredeti koncentrációra, és ez az érték a 4. napig nem változott. Az 5. napon erőteljes koncentráció emelkedést tapasztaltunk ennél a szteroidnál is, de itt a hím embriókat tartalmazó tojásokban mértünk magasabb koncentrációt. Az 5,5 napos csirkeembriót tartalmazó tojásokban szignifikáns csökkenést regisztráltak (Elf et al., 2002), mi a 7. napon szintén, mintegy 33 százalékos T tartalom csökkenést mértünk.

Mindkét szexszteroid tekintetében az 5. napon egy erőteljes emelkedést detektáltunk, ennek egyik lehetséges magyarázata lehet, hogy ekkor jelentkezik először a gonád szteroid termelése, amely kimutatható már a szikből is, majd feltételezésünk szerint a 6. naptól nő az embrió fokozott szteroid felhasználása, s ez a szikben mérhető koncentráció csökkenést eredményez.
Zebrapintyeknél (Gilbert et al., 2007), a szikben az inkubáció 3. és 5. napja közt erőteljes androgén csökkenést mértek, ezzel párhuzamosan a tojásfehérje albumin frakciójában egy erőteljes androgén koncentráció emelkedést rögzítettek. Az androgének (jelen vizsgálatban a DHT és a T) szikből az albumin frakcióba, hipotézisük szerint passzív módon, diffúzió segítségével, kerülnek át (Gilbert et al., 2007). A zebrapintyek költési ideje 12-14 nap, tehát a 3. és 5. nap a kacsa inkubációs idejét tekintve 7. és 10. napnak felelhet meg, ekkor mi is 30-40%-os csökkenést rögzítettünk a tojásszikben.

Ezek alapján az inkubáció 6. napját követő nagymértékű szexuálszteroid csökkenés mögött az embrió fokozott szteroid felhasználása és/vagy az albumin frakcióba történő diffúzió is állhat. A kortikoszteron esetében egy lassú, egyenletes fogyást tapasztaltunk a 8. inkubációs napig, a kiindulási érték mintegy 10 %-át használta fel az *in ovo* fejlődő embrió. A 3,5 napos inkubáció esetében 4,3 %-os csökkenést rögzítettünk. Az *Urosaurus ornatus* gyík esetében az inkubáció 25./36 napján kismértékű felhasználást, azaz koncentráció csökkenést rögzítettek a szerzők (Jennings et al., 2004).

A kisszámú irodalmi adatot is figyelembe véve, összességében megállapítható, hogy az általunk alkalmazott 84 órás inkubáció alkalmasnak tűnik a maternális befektetés meghatározására. Megállapítottuk, hogy az egyes szteroidok turnovere eltérően alakul az inkubáció során.

Javaslatok:
A szik szexuál-szteroidok vizsgálata esetén a 84 órás (3,5 napos) inkubációt meg nem haladó szik-mintavétel javasolható a 28 napos inkubációs nappal rendelkező madárfajok esetén. Ezzel szemben a kortikoszteron esetében, akár 120-144. órás (5-6 napos) inkubáció után is megfelelő eredményt kapható a 28 napos inkubációs periódussal rendelkező fajoknál.

5.3. A faeces képződés kinetikája intakt állatokban. A plazma-bélsár fázis eltolódás tesztoszteron terhelés hatására

A Szent István Egyetem Szaporodásbiológia Laboratóriumában már kilenc éve végzünk kutatásokat arra vonatkozóan, hogy a madár bélsárban levő szteroidokat adekvát módon analizálni lehessen és az így nyert eredményeket élettanilag is értelmezni tudjuk. Ezek a vizsgálatok a külföldön néhány laboratóriumban kidolgozott módszerek kritikai továbbfejlesztését jelentették (Kelemen et al., 2003). A szakirodalomban három munkacsoport eredményeire támaszkodtunk: Tokióban Ishii és munkatársai, Seattle-ben Wasser és munkatársai, Bécsben pedig Möstl és kutatócsoportja foglalkoztak a fekális szteroidok meghatározásának módszertani kérdéseivel (Kikuchi et al., 1994; Wasser et al., 1997; Hirschenhauer et al., 1998). A továbbfejlesztett módszer hatékonyságát munkacsoportunknak számos kísérleti eredménye bizonyította. Az örvös légykapó hímek homlokfolt mérete és költési sikere közötti összefüggést vizsgálták fekális szteroid meghatározási módszert alkalmazva. Megállapították, hogy a fekális T-koncentráció magasabb volt azon hímeknél, amelyeknek nagyobb homlokfoltja volt. Tehát a nagyobb homlokfolt, mint a tojó számára jelzés értékű bélyeg és a hím szexuális aktivitását megalapozó T produkció között erősen pozitív korreláció mutatkozott (Michl et al., 2000). Egy másik kutatás során Biczó et al., (2000) a túzok dürgési magatartását vizsgálták a bélsárral ürített szteroidok (esetükben T és DHEA) mennyiségével összefüggésben.

A fenti kutatások eredményessége mellett a módszer további tökéletesítését tűztük ki célul. Fontosnak tartottuk ugyanis annak megállapítását, hogy a plazma T szintjének- ismert napszakos ingadozása- hogyan jelenik meg az ürülékben. Úgy gondoltuk, a fekális szteroid analízis használhatóságát egyrészt az adja meg, hogy a plazmában megjelenő magas, illetve alacsony koncentrációk kimutathatók-e az ürített szteroid ekvivalensek vonatkozásában. Ez indokolta a T napi ciklusának vizsgálatát, amely segítségével nyomon követhettük a bélsárral történő folyamatos ürülést a vérben mérhető szteroid tartalommal párhuzamosan. Az irodalmi adatok szerint a madarak

T produkciója erősen ivarfüggő és a szaporodási ciklusnak megfelelően határozott szezonalitást mutat (Schumacher és Balthazart 1983, 1984; Hall, 1994). Ezen eltéréseket egyaránt detektálni lehetett a plazma androgén szint és a fekális szteroid koncentráció méréseivel (Hirschenhauser et al., 2000b).

A fekális szteroid analízis értelmezésének másik alapvető kérdése a chimus-bélsár áthaladási sebességének ismerete. Vizsgálataink alatt már a retenciós idő mérése során is jelentős ivari és szezonális különbségeket észleltünk. Legtöbbet vizsgált faj, a csirke esetében a jelölt takarmány fekális megjelenése 1,6-2,6 óra körül alakul (Dansky és Hill 1952), a teljes retenciós időt pedig 5-9 órára becsülik. A retenciós idő fiziológiás szempontból kifejezőbb, mint a megjelenés időpontjának vizsgálata (Denbov, 2001).

Korábbi megfigyelések szerint fajon belül a retenciós idő az életkor előre haladásával növekszik (Shires, 1987), és a környezet hőmérsékletének emelkedése fokozza a retenciós időt (Denbov, 2001). Víziszárnyasokról kevés adat áll rendelkezésünkre: lúdon (Hirschenhauser et al., 2000b) azt találták, hogy a jelölt takarmány 2-4 óra múlva jelent meg a faecesben, a retenciós időről adatot nem közöltek. Jelen vizsgálatban a táplálék áthaladásának két paraméterét határoztuk meg: áthaladási idő és megjelenési idő. Ennek ismeretében értelmeztük a bélsárban megjelent exogén eredetű T (*i.p.* terhelés) kiürülését.

A színezett takarmány fekális megjelenése a hímekben mindkét időszakban hamarabb következett be, mint nőstényekben, de a poszterfrakter időszakban a különbség kifejezettebb volt. A reproduktív időszakban a színezett takarmány első megjelenésének ideje megduplázódik a posztrefrakter időszakhoz képest mindkét ivarban. A retenciós idő (total passage time) (243-254 min.) periódustól és ivartól függetlenül mindkét esetben azonosan alakult, ez 1-5 órával rövidebb, mint amit csirkénél Denbov (2000) talált. Tudomásunk szerint az ivartól függő exkréciós sebességre vonatkozóan eddig adatokat nem közöltek.

Mindkét vizsgálati ciklusban a tojóknál később jelent meg az első színezett faeces, mint a gácsérok esetében. Az eltérés ideje majdnem kétszeres volt, igaz ez a nagy különbség tavasszal kissé mérséklődött. A tavaszi vizsgálati időszakban mindkét ivarban megnőtt az első festett minta megjelenésének ideje, azonban itt is a gácsérok chimus áthaladása bizonyult rövidebbnek. Az áthaladás sebességének csökkenése, ivartól függetlenül a reproduktív állapotnak tudható be. Nagyobb egyedi különbségeket észleltünk a gácséroknál, amely azt bizonyíthatja, hogy a folyamatos udvarlás és a gyakori párzás mellett az állatok nem fordítanak annyi időt táplálkozásra, mint ősszel. Ősszel a madaraknál is van télre való felkészülés, amely elsősorban a szubkután lipid depo kialakulásában jelentkezik. Az első minta megjelenésének idejében jelentkező ivari és egyedi

különbségek ellenére a teljes kiürülés időtartama (első már tiszta, festéket nem tartalmazó faeces) nem mutatott jelentős különbséget az egyedek között.

A plazma és faeces szteroid tartalom összefüggésének vizsgálatát oly módon végeztük el, hogy az élettani koncentráció 100x-ának intraperitoneális bejuttatásával gyors plazma T szint növekedést idéztünk elő. Így elkerültük az intravénás injekció folyadék-volumen háztartást erősebben terhelő hatását.

A két vizsgálati időszakban a ciklusok eltérő élettani háttere miatt különböző válaszreakciókat kaptunk. Az őszi -szexuálisan inaktív- állapotban, egy órával a T bejuttatása után (ekkor volt az első vérvétel) mind két ivarban a plazma T koncentrációja jelentős csúcsot adott és ekkor már a bélsárban is jelentkezett a fokozott T kiürülés (egyedi eltérést csak 1 alkalommal figyeltünk meg).

Tavasszal – a szexuálisan aktív időszakban - a gácsérokat jellemző alapvetően jóval magasabb plazma T-szint (őszi érték 10x-e) az injekció után 1 óra múlva még változatlan, majd ezt követően erőteljesen csökken, két óra múlva pedig minimum értékek alakultak ki. Ennek hátterében valószínűleg a T koncentráció további extrém növekedését megakadályozó negatív feed back mechanizmus áll (Péczely 1987). Péczely és Kovács (1998) által végzett - egy teljes évet felölelő - kísérlet megállapította, hogy egész évben mérhető mennyiségű T mutatható ki a vérplazmából, amely koncentráció november végétől megemelkedik és június végéig magas szinten marad.

A tojóknál az ősszel tapasztalt, az injekciót 1 órával követő csúcs megfigyelhető volt tavasszal is, egy madár kivételével. Az átlagtól eltérő tojó plazma szteroid kinetikája a gácsérok görbéjének lefutásával azonos képet adott, amely bebizonyította számunkra, hogy a gácséroknál tavasszal tapasztalt feed-back hatás nem az ivari különbségek miatt következik be, hanem a rendkívül magas T-koncentráció hatására. A fenti eredmények igazolták, hogy az endogén T-szint jelentősen befolyásolja a beadott szteroid turnoverének alakulását, amely mind a vérplazmában levő, mind pedig a bélsárban ürített hormontartalom alakulásában kimutatható.

Az intraperitoneálisan alkalmazott T terhelés és a bélsárral történő fokozott szteroid ürítés időbeli kapcsolata a plazmaszint és a fekális koncentráció összefüggését, a T turnover aktuális állapotát jelzi.

A T terhelésnek mindkét ivarban egy korai intenzív és egy későbbi kevésbé intenzív, elhúzódó periódusa van. A hímeknél a terhelését követő intenzív kiürülési szakasz rövidebb az inaktív periódusban és az exkréciós görbe csúcsértéke magasabb, mint az aktív fázisban. A fiziológiás T turnover napi alakulását túzokban vizsgálták, ahol megállapítható volt az, hogy a csúcs helye és a csúcs nagysága szezonálisan, illetve a kakas aktivitásának függvényében változik (Biczó és Péczely, 2007). A terhelés hatása 5 órán keresztül volt kimutatható a posztrefrakter és szexuálisan aktív állatokban egyaránt.

A tojókban nincs különbség a terhelést követő intenzív kiürülési szakaszok között a posztrefrakter és a szexuálisan aktív állatok esetében. A szexuálisan inaktív állatokban a kiürülési görbe csúcsa -hímekhez hasonlóan- magasabb, mint a szaporodási ciklusban. A terhelés hatása hímekhez ugyancsak hasonlóan 5 óráig tart.

A terhelést követő intenzív kiürülési szakasz hímekben hamarabb jelentkezik, mint nőstényekben. A teljes kiürülési periódus mindkét ivarban azonos hosszúságú (a beadást követő 5 óra múlva) végződik. A T kiürülési görbe karakterisztikája, tehát megegyezik a takarmány-chimus-faeces áthaladással, mindkét ivarban és mind az aktív és mind az inaktív periódusban.

Vizsgálatainkkal sikerült az általunk használt fekális szteroid analízist továbbfejlesztenünk. A bélsár minták 37°C-on történő abszolút szárazra párlásával kiküszöbölhetők a kacsánál jelentkező víztartalombeli különbségek, amellyel csökkenthetjük a mérési hibákat és az egyes minták fekális T-koncentrációi nagyobb biztonsággal hasonlíthatók össze. A korábbi kísérleteinkben (Kelemen et al, 2003) nedves bélsármintákat alkalmaztunk és az ideális mennyiséget 2 mg-ban adtuk meg. Az általunk alkalmazott beszárítás során megállapítható volt, hogy tőkés réce esetében a 2 mg nedves, 0,5 mg abszolút száraz mintának felel meg és a méréseink során következetesen ezt a mennyiséget találtuk helyesnek.

Vizsgálataink másrészt igazolják azt a feltevésünket, hogy a chimus-bélsár áthaladási sebessége ivar- és szezonfüggő a tőkés récében, a szexuális aktivitás idején minkét ivarban megnövekszik. Megállapítottuk továbbá azt is, hogy az exogén**,** nagy mennyiségű szteroid bevitel alkalmazhatósága a turnover vizsgálatára alapvetően attól függ, hogy a kísérleti állat (ivar- és szezonfüggően) alacsony vagy magas endogén koncentrációval rendelkezik.

Javaslatok:

A fekális szteroid analízis adekvát módszernek tűnik madarak (baromfi fajok) endokrin státuszának vizsgálatára. Nagy előnye a minta non-invasiv gyűjtése, a minta könnyű tárolása és a jó reproduktibilitás. Azonban e módszer alkalmazása esetén előzetes chimus-bélsár áthaladási vizsgálatokra van szükség, hogy reálisan tudjuk értelmezi az eredményeinket. A defekációs frekvencia ismeretében a szabadon mozgó madáron vizsgálható a szteroid turnover és az egyes szteroid hormonok közti funkcionális interreláció is.

5.4. Maternális stressz hatása a tojástermelésre, szteroid allokációra és az utódokra

Munkahipotézisünk az volt, hogy stresszhatásokat követően a tojásprodukció több jellemzője megváltozik, s ezek között a szikbe deponált szteroid-hormonok mennyisége és megoszlása is. A mennyiség, illetve a hormonok arányának megváltozása befolyásolhatja a kelési paramétereket, az

utódok életrevalóságát és a majdani reprodukciós kapacitását is és/vagy akár az utódok ivararányát is.

Egyrészt a handling stresszt vizsgáltuk. Lagadic és munkatársai (1990) szerint már a madarak kézbevétele is stresszként hat, márpedig a vérvétel kivitelezhetetlen a madarak megfogása nélkül. Másrészt egy ún. fizikális stresszort, az éter inhalációt teszteltük. Ennek hatása a kortikotrop tengelyre jól ismert madarakon is. Az éter inhaláció az eminentia mediana CRF tartalmát már 2-15 perc múlva csökkenti, illetve a plazma ACTH szintjét 5 perc múlva, a kortikoszteron koncentrációt pedig 10-15 perc múlva emeli meg szignifikánsan (Kovács és Péczely, 1991).

Mindkét stresszornál, mindegyik ismétlésnél és kombinációnál a kezeléseket követően egy rövid idejű (3-5 napig tartó) 10-30 százalékos tojástermelés visszaesés volt megfigyelhető, ami összhangban van Péczely és Pethes (1978) japán fürjön végzett megfigyeléseivel. Ezzel szemben a szangvinikus vérmérsékletű gyöngytyúknál ugyanezek a kezelések mintegy 20-45%-os folyamatos produkció csökkenést okoztak (Biczó et al., 2003, 2004). A tojástermelés depressziója mellett az átlagos tojástömeg növekedése volt tapasztalható. A tojásszám csökkenését és tömegének növekedését figyeltük meg a gyöngytyúk esetében (Biczó et al., 2003), illetve házityúknál is (Szőke et al., 2006). Ugyan ilyen megállapításra jutottak egy korábbi vadkacsákon végzett kísérletben Pietz és munkatársai (1993), mely szerint a hátukra szerelt rádiótelemetriás adókészülék csökkentette a fészekalj nagyságát és növelte a tojások méretét. Emellett az állattenyésztési gyakorlatból is ismert, hogy a felnevelés alatti tartástechnológiai anomáliák –mint stresszorok- túl nagy méretű tojások termelését is indukálhatják (Technical Bulletin-Hendrix Poultry Breeders, 2004). A tojásméret növekedés fiziológiai háttere még nem tisztázott, egyes vélemények szerint seregélyeknél (Meijer, 1992) a magasabb B és P4 hatására megnő az ovuláció cirkadiális ritmusa (pl. 25h versus 23h), így a tojás mérete is megnő. Hosszabb idő jut az ún. gyors szikbeépülésre, s ennek következtében nő a szik mérete (Etches, 1996).

A stresszelt csoportok kelési százaléka átlagban mintegy 20%-kal elmaradt a kontrollokhoz képest és ez a különbség jórészt a két-háromszorosára emelkedett korai embrió elhalásból adódott. A korai embrió elhalás tényét igazolják a 84 órahosszat inkubált tojások vizsgálati eredményei is, ahol az elhalt (**0** kategória) és az abnormális embriót (**1** kategória) tartalmazó tojások száma megnövekedett a kezelések következményeként.

Gyöngytyúkon végzett vizsgálatainkkor a kelés átlagosan 15 százalékkal csökkent, s ennél a fajnál is korai embrió elhalás mértéke duplázódott meg. A kezelt csoport utódai pedig mintegy 24 órával előbb keltek, mint a kontroll csibék (Biczó et al., 2004). A megemelkedett korai embrió elhalási megfigyelésünket támasztja alá Janczak és munkatársai (2006) eredménye is, mely szerint a kortikoszteron injektált tojásokban fejlődő tyúkembriók mortalitása az inkubáció első hetében volt a legmagasabb, 15-20 %-kal kaptak magasabb értéket, mint csak szezámolajjal kezelt kontroll tojások

esetében. Mi is hasonló értéket tapasztaltunk, szintén házityúkban, ahol a tojásszikben stresszhatásra megemelkedett kortikoszteron koncentráció, 15-23%-os embrió mortalitást okozott az inkubáció első öt napjában (Szőke et al., 2006). Ellentétes eredményt kaptak a sárgalábú sirálynál, ahol a szikben mesterségesen megemelt kortikoszteron tartalom nem okozott fokozott inkubáció alatti embrió mortalitást, de a kelési időt meghosszabbította (Rubolini et al., 2005).

A kezelt csoportokban (első évben a 2. csoport, második évben a K2 és H1 csoport) a fiókák tömeges kelése átlagosan 12 órával megelőzte a kontroll csoportét. Ennek hátterében a stressz hatására megnövekedett androgén koncentráció állhat. Dankasirályon végzett kutatások ugyancsak azt igazolták, hogy a T injektált tojások hamarabb keltek, azaz csökkent az inkubációs periódusuk, így mérsékelve a kelési aszinkrónia jelenségét (Eising és Groothuis, 2002). A fenti eredmények azt sugallják, hogy stressz hatására vagy kísérletesen megemelt T szint már embrionális korban, *in ovo* fejtheti ki hatását.

Az első handling stressz kísérletnél az életképes napos kacsák testtömege azonos volt a kontroll és a kezelt csoportban, de egyhetes korban a kezelt csoport utódai szignifikánsan kisebbek voltak, mint a kontroll társaik. Az éter stressz hatására már a kikeléskori testtömeg is alacsonyabb volt. Hasonló eredményt kaptak Hayward és Wingfield (2004), amikor is a megemelkedett szik-kortikoszteron tartalom csökkentette a kezelt csoport tojásainak kelési százalékát, és az ezekből kikelő fürjcsibék lassabban nőttek, fejlődtek, mint kontroll társaik. Ez vizsgálat csak 2 hétig követte nyomon a testtömeg-gyarapodást. Megegyező hatást értek el a szikbe injektált kortikoszteron segítségével: seregély esetében a glükokortikoid bevitel kisebb hím fiókákat eredményezett (Love et al., 2005). Esetünkben a kiskacsák hátránya csak a juvenilis vedlés (8. élethét) kezdetéig maradt meg, ezt követően ugyanis a stresszelt csoport utódai gyorsabban és többnyire egyszerre fejezték be a vedlésüket és így a 12. élethéten már utolérték, sőt a gácsérok átlagos testtömege el is hagyta a kontroll csoportba tartozó társaikét. Ennek hátterében a magasabb T koncentráció állhat, hiszen a stresszelt tojóktól származó juvenilis állatok mindkét ivarú egyedeinél a plazma T szintje is szignifikánsan magasabb értéket mutatott. Irodalmi adatok alapján tudjuk, hogy a megemelkedett szik androgén koncentráció és a fiókák növekedési erélye között összefüggés találtak, mely mögött az androgéneknek a növekedési rátára gyakorolt közvetlen élettani hatása és a fokozott anyagcserére állhat (Gil et al, 2003).

A második évben az F2 generáción a handling stressz okozta testtömeg-csökkenést nem tudtuk igazolni a K1 és K2 csoport a 4. élethétig megegyezett. Ráadásul, ahol már a nagyszülők is stressz kezelésnek voltak kitéve, a H1-es csoport utódai szignifikánsan magasabb testtömeget mutattak napos- ill. egyhetes korban, mint a kezelést nem kapó H2-es kiskacsák. Amely hátterében egy esetleges adaptációs képesség is állhat.

Ezek alapján arra konklúzióra juthatunk, hogy az anyát ért stressz hatása az utódot élete során későbbiekben is jelentősen befolyásolhatja. Ezt igazolja az is, amikor Az F1 nemzedék stressz kezelései előtt végeztünk egy próbakeltetést, ahol K csoportok kelési sikere 80% feletti értéket mutatot, míg a handling csoportoknál: 70% volt a kelési százalék berakott tojásra vetítve. Azaz a maternális stressz kezelés kihatott az utódok reprodukciós képességére is.

Vizsgáltuk, hogy a stresszkezelések, milyen szteroid koncentráció-változásokat indukálnak a tojókban, ez hogy jelenik meg a tojásszikben, és végül a juvenilis madarakban.

A következő táblázatból (*53. táblázat*) jól kitűnik, hogy a két stresszor hatására jelentős szteroid koncentráció-változások detektáhatók szülők faecesében.

53. táblázat A két stresszor hatásaként jelentkező fekális szteroid koncentráció-változások a tojó madaraknál

*↑: koncentráció-emelkedés, ↓: koncentráció csökkenés, **0:** nincs változás*

Bélsár	Handling 2002	Éter 2002	Handling 2003	Éter 2003
Tojók bélsár szteroid koncentrációi	**mater**	**mater**	**mater**	**mater**
’2’ kezelt csop. (2002)	B↑ (25%)	B↑ (58%)	-	-
	T↑ (17%)	T↑ (10,5%)	-	-
	DHEA **0**	DHEA↑(10,5%)	-	-
	E2↓ (26%)	E2↓ (19%)	-	-
	P4↑ (12%)	P4↑ (19%)	-	-
K2 stresszelt (F1) (P: 2002-es kontroll)	-	-	B↑ **(23%)**	B↑**(9%)**
	-	-	T↑ **(16%)**	T↑ **(5%)**
	-	-	DHEA↑ **(12%)**	DHEA↑ **(24%)**
	-	-	E2↓ **(25%)**	E2↓ **(3%)**
	-	-	P4↑**(18%)**	P4↑**(11%)**
H1 stresszelt (F1) (P: 2002-es B csop.) H2 kontroll csop-hoz viszonyítva	-	-	B↑**(34%)**	B↑ **(35%)**
	-	-	T↑ **(12%)**	T↑ **(3%)**
	-	-	DHEA↑ **(19%)**	DHEA **0**
	-	-	E2↓ **(15%)**	E2↓ **(11%)**
	-	-	P4↑**(18%)**	P4↑ **(9%)**

A stressz hatására minden esetben emelkedett fekális B szint a jellemző, ezzel párhuzamosan a P4 és az esetek többségében az androgének (T és DHEA) is megnövekedett értékeket mutatnak. Korábbi ismereteink alapján egyrészt tudjuk, hogy a P4 a B prekurzora, és stressz hatására a mellékvese nagy mennyiségű P4-t is bocsát a véráramba (Péczely és Pethes 1978). Másrészt a megnövekedett fekális P4 koncentráció hátterében gonadiális eredet is állhat, hiszen összefüggés lehet az ováriumban fejlődő következő F1 tüsző nemzedékkel is (Forgó et al., 1988b). A megnövekedett androgén koncentrációnak egyrészt stressz-védő szerepe lehet, mellyel ellensúlyozza a magas glükokortikoid szint mind a szervezetre, mind pedig az embriogenezisre gyakorolt káros hatásait. A tojásszikbe deponált magasabb androgén szinttel védi a tojó az *in ovo*

fejlődő utódokat. Dankasirály fiókákon végzett kísérletek igazolták, hogy a szik tesztoszteron tartalma és a kikelt fiókák agresszivitása és életrevalósága között határozott pozitív összefüggés volt kimutatható (Eising et al., 2001). A B és T szinergizmusát találták tarka vércsében is, ahol T injektált tojásokból kikelt fiókák plazma B szintje magasabb volt, mint kontroll társaiké (Sockman és Schwabl, 2001). A DHEA szint egyidejű emelkedésének magyarázata lehet, hogy mint prekurzor könnyen konvertálódhat tesztoszteronná (Ferree et al., 2004). A tojásba allokált magas DHEA tartalom, alternatív módja lehet a T deponálásnak: DHEA (3β- hidroxyszteroid-dehidrogenáz (HSD) enzim) →A4 (17β-HSD enzim) →T (Hau et al., 2004, Soma et al., 2004). A DHEA emlősökben, mint anti-stressz hormon hat, gátolja a stressz okozta testtömeg csökkenést, mellékvese tömeg növekedését (McIntosh et al., 2000), a glükokortikoid receptorszám növekedést a májban, lépben és a *thymusban* (Hu et al., 2000).

A stressz hatására E2 szint erőteljes koncentráció csökkenését mértük, ezzel párhumazosan tojástermelés kismértékű redukciója volt megfigyelhető. Korábbi megfigyelések alapján a szexuálisan aktív fürjtojókon, a kortikoszteronkezelést követően, a petefészek tömege kismértékben csökkent (a sárga follikulusok száma csökkent). Ebből következően a tojástermelés kismértékű redukciója jellemző. A plazma szexuálszteroid szintjében jelentős változások következtek be: nőtt a progeszteron és erősen csökken a 17-β-ösztradiol és az ösztron koncentrációja (Péczely és Pethes, 1978).

Összehasonlítottuk az F1 generáció két kontroll csoportját (*54. táblázat*) is, hogy a maternális stresszhatás, illetve az anyai szteroid allokáció, miként befolyásolja a bazális szteroid szintet.

54. táblázat Az F1 generáció két kontroll csoport fekális szteroid koncentrációinak összevetése
*↑: koncentráció-emelkedés, ↓: koncentráció csökkenés, **0:** nincs változás*

Bélsár	Handling 2003	Éter 2003
Tojók bélsár szteroid koncentrációi	**mater**	**mater**
H2 (F1) kontroll csoport (*P: 2002-es 2. csop.*) Az abszolút kontroll (K1) csoporthoz viszonyítva	*B **0***	*B **0***
	*T↑**(14%)***	*T↑**(9%)***
	*DHEA↑**(7%)***	*DHEA↑**(14%)***
	*E2↓**(20%)***	*E2 **0***
	*P4↑**(9%)***	*P4↑**(7%)***

Várakozásainkkal szemben, az alap B szintben nem találtunk különbséget, viszont a T, DHEA és P4 szintek esetében magasabb bazális értékeket kaptunk, hasonlóan az anyamadarat ért stressz hatásokhoz. Ezen értékek emelkedése-az abszolút kontrollhoz képest- embrionális örökség lehet, amely adult korban is hatással van az egyedre, sőt a következő F2 generációra is. A különböző

mesterségesen emelt androgén koncentrációk vizsgálataiban az utódokat csak néhány hétig követték nyomon (Lipar és Ketterson, 2000; Lipar, 2001; Eising és Groothuis, 2002; Gil et al., 2003). Azok reprodukciós képességére, illetve az F2 nemzedékre vonatkozó adatokat eddig még nem közöltek. A felnevelés során az F1 generáció ivarérésében jelentős különbséget találtunk: a handling stresszkezelést kapott tojók utódainak ivarérése 6 héttel később következett be.

Vizsgáltuk a két stresszor hatását a tojásszikben megjelenő szteroid koncentráció-változásokra is. A 84 óra hosszat inkubált tojásokban lévő embriók genetikai ivarát meghatároztuk, s az ivar szerint választottuk szét a tojások szik tartalmának hormon koncentrációit.

55. táblázat A stresszkezelések hatásai az öt vizsgált szik-szteroid koncentráció változásaira a hím- illetve nőivarú embriót tartalmazó tojásokban

*↑: koncentráció-emelkedés, ↓: koncentráció csökkenés, **0:** nincs változás*

SZIK	Handling 2002		Éter 2002		Handling 2003		Éter 2003	
♀ vagy♂ embriót tartalmazó tojásszik	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂
„2.” kezelt csop. (2002)	B↑	B↑	B↑	B↑	-	-	-	-
	E2↑	T↑	T↑		-	-	-	-
		DHEA↓	P4↑		-	-	-	-
K2 kezelt (P: 2002-es kontroll)	-	-	-	-	B↑	B↑	B↑	B↑
	-	-	-	-	T↑			T↑
H1 kezelt (P: 2002-es „2.” csop.)	-	-	-	-	B↑	-	B↑	B↑
	-	-	-	-	T↑		T↑	

Megállapítható (*55. táblázat*), hogy a szikben is szinte mindenhol kortikoszteron-emelkedés mutatható ki. A bélsárból kimutatható B emelkedés tükröződött a tojásszikben is: mind a nőivarú-, mind a hímivarú embriókat tartalmazó tojásokban szignifikánsan magasabb értékeket detektáltunk. Ez az eredményünk jól korrelál Hayward és Wingfield, 2004-es adataival, mely szerint a tojókba sylastic kapszulába, szubkután implantált kortikoszteronból a megemelkedett kortikoszteron koncentráció átjutott a tojásszikbe. Tehát a vérplazmában/bélsárban mért magasabb glükokortikoid koncentráció összefüggésben áll a szikben található magasabb értékkel.

A megnövekedett glükokortikoid koncentráció és a tojás tömegének emelkedése között közepes illetve szoros összefüggést találtunk (r=+0.60-+0.80). Ugyanezt az eredményt kaptuk tojó tyúkoknál is, ahol a mesterséges termékenyítés növelte az átlagos tojástömeget, és a megnövekedett tojásméret és a megemelkedett kortikoszteron közt korrelációt detektáltunk r=+0,65 (Szőke et al., 2006). Meglepő és új eredményt kaptunk, mely szerint az elhalt embriókat tartalmazó tojásokban a magas B koncentráció, kezeléstől függetlenül a tojás tömegének növekedésével párosult. Azonos

eredményt kaptunk házi tyúk esetében is, a természetes párzású kontroll csoportban az extrém magas B koncentráció ugyancsak embrió elhalással járt (Szőke et al., 2006).

A fenti táblázat (*55.*) sejteti, hogy a megemelkedett tesztoszteron szintnek is reguláló szerepe lehet. Egyrészt az inkubációs idő csökkentésében, másrészt a stresszelt tojóktól származó utódok intenzívebb testtömeg gyarapodásában, hiszen a kezdeti elmaradásukat gyorsan kompenzálták. A tőkés récét alapesetben az irodalom a preferenciális, differenciált allokáció típusba sorolja, mely szerint a tojók, ha attraktív párjuk van, emelik tojásaik átlagos androgén szintjét (Cunningham és Russel, 2000), azonban most nem beszélhetünk fiziológiai alapesetről, az hogy stresszhatására megemeli a szikbe deponált androgén koncentrációkat, azaz ez mintegy kompenzatórikus allokációnak felelhet meg.

Az elhullásban nem találtunk különbségeket. Ezen megfigyeléseink egybevágnak Gil és munkatársai 2003-as füsti fecskéken kapott eredményeivel, miszerint a szikbe deponált koncentráció pozitívan korrelált a fiókák növekedési erélyével, de keléskor nem volt különbség a kelési testtömeg és méret vonatkozásában sem.

A tojásszik szteroid koncentrációkat is összehasonlítottuk az F1 generáció két kontroll csoportjában (K1, H2), a stresszelt tojóktól származó madarak tojásszik T szintjében szignifikánsan magasabb értéket találtunk, tehát az embrionális korban magasabb T koncentrációnak kitett tojók, magasabb alap T szinttel bírnak. Ezt igazolja mind a bélsárban-, mind a szikben detektálható magasabb T érték is.

Kerestük a választ, hogy a maternális tojásszik szteroid allokáció mutat-e ivari különbséget. Ehhez a kérdéskör vizsgálatához csak az abszolút kontroll ('1' és K1 csoport) eredményeit használtuk fel.

56. táblázat Ivari különbségek a tojásszik szteroid koncentráció között a kontroll csoportokban ('1' és K1 csoport)

	Handling 2002 kontroll csoportja „**1. csoport**"		Éter 2002 kontroll csoportja „**1. csoport**"		Handling 2003 abszolút kontroll csoportja „**K1**"		Éter 2003 abszolút kontroll csoportja „**K1**"	
♀ vagy♂ embriót tartal-mazó tojásszik	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂
T	NS		hím: magasabb		hím: magasabb		NS	
DHEA	hím: magasabb		hím: magasabb		hím: magasabb		hím: magasabb	
E2	hím: magasabb		hím: magasabb		hím: magasabb		hím: magasabb	
P4	NS		hím: magasabb		NS		NS	
B	hím: magasabb		hím: magasabb		NS		NS	

A T, a B és a P4 esetében egyes vizsgálatoknál találtunk ivari különbséget, míg más időpontokban nem, tehát a sem megerősíteni, sem cáfolni nem tudjuk az irodalomban is egymással ellentétes eredményeket.

A DHEA esetében azonban minden vizsgálatnál, sőt a stressz csoportoknál is hímivarú embriót tartalmazó tojásszikben szignifikánsabb magasabb értékeket mértünk. Ezidáig az irodalomban még nem publikáltak a szikben mérhető DHEA szintek közti ivari különbséget.

Az E2 koncentrációkat tekintve a várttal ellentétes eredményt kaptunk, minden ismétlésnél, időponttól függetlenül mindig a hímivarú embriókat tartalmazó tojásokban mértünk magasabb szinteket. Az irodalom főként az androgéneket taglalja, az E2-ra kevés figyelem jut, Petrie et al., (2001) kissé szkeptikusan fogadható eredményei alapján a 10 napig inkubált nőivarú pávaembrióknál szignifikánsan magasabb értéket kapott. Japán fürj tojásokon végzett kutatások (Pilz et al., 2005) nem találtak ivari különbséget a frissen letojt tojások között, azonban 10 nap inkubáció után a nőivarú embriót tartalmazó tojásokban szignifikánsan magasabb értéket mutatott.

A 4 hetes utódoktól vért vettünk, s a plazmakoncentráció változásait az alábbi táblázatban (*57.*) értékeltük.

57. táblázat A stresszkezelések hatásai a plazma szteriod koncentráció változásaira az F1 és F2 generáció hím- és nőivarú utódaiban

*↑: koncentráció-emelkedés, ↓: koncentráció csökkenés, **0:** nincs változás*

Vérplazma	Handling 2002 F1		Éter 2002 F1		Handling 2003 F2		Éter 2003 F2	
♀ vagy♂ F1 és F2 nemzedék	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂
„2." kezelt csop. (2002) F1	T↑	T↑	T↑	T↑	-	-	-	-
	E2↑	DHEA↑	P4↑	DHEA↑	-	-	-	-
		E2↓			-	-	-	-
K2 kezelt (P: 2002-es kontroll)	-	-	-	-		T↑		
	-	-	-	-				
H1 kezelt (P: 2002-es „2." csop.)	-	-	-	-		T↑		
	-	-	-	-				

A stressz hatására, a fiókákban, a plazmában többnyire T emelkedést találtunk, a 2002-es stressz vizsgálatoknál a hímivarban DHEA, míg a nőivarban E2 és P4 emelkedést detektáltunk. Ennél a vizsgálatnál talán előnyösebb lett volna bélsár mintavétel a vérvétel helyett. A vérből történő analízis hátránya, hogy pillanatnyi fiziológiai állapotot tükröz, nagyon nagy az egyedi különbség, ezért igen magas szórásértékeket kaptunk. Jelen esetben fekális analízis ún. „átlagoló", napi ritmust elfedő tulajdonsága jobb megoldás lehetett volna. A bélsárgyűjtés technikai okok miatt

nem volt kivitelezhető, az összes fiatal állatot, egyedileg azonosítottuk és együtt tartottuk a felnevelés alatt.

Emellett vizsgáltuk a szekunder ivararányt, azaz a kikelt utódok ivarmegoszlását is. Megállapítottuk, hogy a stressz kezelések hatására nőtt a hímivarú utódok száma. Korábban már utaltunk rá, hogy megnőtt a korai embrió elhalás mértéke. A 84 órás inkubációt követő tojásszik- illetve az embrió státuszát megállapító vizsgálatok alapján - ahol az elhalt embriók között nagyobb mértékben voltak a nőivarú embriók - feltételezhetjük, hogy a ki nem kelt fiókák közt is a nőivar lehetetett túlsúlyban. Az is igaz, ezt a feltételezést, jobb lett volna a ki nem kelt embriók molekuláris szexálásával tényszerűen bizonyítani. Vagyis hipotézisünk szerint a primer ivareloszlás azonosan alakult, csak szekunder ivararány mutat a hímivar irányába kismértékű eltolódást.

Egyrészt a megemelkedett kortikoszteron koncentráció mellett a megváltozott T koncentráció okozhatja a nőivarú embriók elhalását. A megnövekedett androgén tartalomnak mintegy ún. stressz-védő szerepe lehet, azonban a nőivarú embrió fejlődésének a magas androgén koncentráció hormonális közeg nem kedvez. Ezt a feltételezésünket támasztja alá, hogy a pávatojóknál a plazma emelkedett T szintjével párhuzamosan emelkedett a hímivarú embriók aránya (Pike és Petrie, 2005). Bár a következő irodalmi adat épp ellenkező ivararány-változást mutat be, de hipotézisünket ez eredmény is megerősítheti: Zebrapintyeknél közvetlenül a tojásrakási periódust megelőzően az ösztrogénnel injektált tojók szignifikánsan több nőivarú fiókát produkáltak (Williams, 1999, von Engelhardt et al., 2004). Ez a megállapítás csak a szekunder ivarmegoszlást tekintve igaz, mert a hímivarú embriók mortalitása jóval nagyobb volt az inkubáció alatt (von Engelhardt et al., 2004). A fenti eredmények sem élettani-, sem pedig patológiai magyarázatot nem adnak a nőivarú embriók nagyobb arányú elhalására.

Azonban találtam olyan irodalmi adatot, mely szerint a házi pirók *(Carpodacus mexicanus)* esetében találták, hogy a Z ivari kromoszómát tartalmazó pre-ovulációs oocyta (ezekből lesznek a hímivarú utódok) gyorsabban fejlődnek és a fészekalj első tojásai lesznek a hímivarú utódok, míg a nőivarú embriókat tartalmazó tojások adják a fészekalja tojásokat. Az első tojásoknak a kelési sikere nagyobb és így a szekunder ivararányt tekintve hímivar kerül túlsúlyba (Young és Badyaev, 2004; Badyaev et al., 2005). Másik adat szerint a nőivarú embrió lassabban fejlődik a korai embriogenezis során (Gilbert et al., 2007).

A fentiek alapján, egy másik lehetséges magyarázata lehet a nőivar nagyobb arányú elpusztulásának, hogy az embriogenezis korai szakaszában lassabb ütemű fejlődés miatt a magas koncentrációban lévő kortikoszteron koncentráció tovább lassítja a korai fejlődést és ennek következtében nagyobb mértékű az elhalás.

Eredményeinket összefoglalva elmondhatjuk, hogy a tojót ért stressz hatással van a tojástermelésre, kelésre, a tojásméretre, valamint az utódok embrionális és kikelés utáni fejlődésére. Tehát újabb bizonyítékát adtuk az anyai hatás fontosságának ovipara állatokban. Igazoltuk azt a feltevést, hogy a tojó szteroid hormonok útján akár szándékosan (is), de befolyásolni tudja utódai jövőjét.

Javaslatok:

Ezen vizsgálatok alátámasztják a maternális szteroid allokáció fontosságát, valamint felhívhatják a baromfitartók figyelmét is arra, hogy a termelés alatt különösképpen kerülni kell a zavaró beavatkozásokat. Hiszen, ha csekély visszaesést tapasztalunk a tojástermelésben, akkor a korai embrió elhalás szignifikáns megemelkedése az egy tojóra eső napos állat kihozatalt csökkenti, így ez érzékenyen érintheti a termelés gazdaságosságát is.

6. ÖSSZEFOGLALÁS

A tojómadarat ért különböző környezeti hatások elősegítik az utód anyagcseréjének adaptív szempontú felkészítését, illetve áthangolását. Ez csakis „rugalmas”, gyorsan modulálható, epigenetikus információ átadással valósulhat meg. Vizsgálataink központi kérdései: milyen stratégiát alkalmazhat a tojó utódai védelmében szuboptimális körülmények között? Van-e ebben a folyamatban valamilyen szerepe a szteroidoknak? Ennek modellezését és a kérdés megválaszolását stressz-hatások kísérletes alkalmazásával próbáltuk megvalósítani. Vizsgálatainkban egyrészt a „neurogén jellegű” kézbevételi, ún. handling-, másrészt a fizikális éter-kezelés stresszhatásait értékeltük a tojó-, valamint az embrió perinatális- és az utód posztnatális fejlődése szempontjából.

Kísérleteinket Gödöllőn a Szent István Egyetem, Szaporodásbiológiai Laboratóriumában, illetve annak kísérleti teszt óljaiban végeztük. A kísérletekben a szemi-domesztikált tőkés réce fajt használtuk.

A kísérletek megalapozásához, első lépésben egy megbízható, egyszerűsített tojásszik extrakciós módszert fejlesztettünk ki, majd optimalizáltuk az ezt követő szteroid analízist. Vizsgálataink alapján a dietil-éteres extrakció Triton-X-100-as előkezeléssel kiegészítve bizonyult a leghatékonyabbnak.

Második lépésként arra a kérdésre kerestük a választ, hogy a tőkés réce embrió szteroid termelését, illetve a szteroid hormonok felhasználását az inkubáció hányadik napjától lehet figyelembe venni, hogy reális képet nyerjünk a maternális eredetű szteroidok koncentrációjáról. A szik tesztoszteron (T) és 17- β -ösztradiol (E2) koncentráció-változásai a 4. napig nem mutatnak radikális változást, míg a kortikoszteron-szint (B) egyenletesen csökkent a 8. inkubációs napig. Tehát az általunk alkalmazott 84 órás inkubáció alkalmasnak bizonyult a maternális befektetés meghatározására.

Harmadik lépésben célszerűnek tartottuk a plazma T szint ismert napszakos ingadozásának kimutatását a bélsárban is. Ehhez szükséges volt a takarmány-áthaladásnak vizsgálata mindkét ivarban a szexuálisan aktív és inaktív időszakban is. Megállapítottuk, hogy a takarmány áthaladás időtartama ivar- és szezonfüggő. Elsőként írtuk le az ivartól függő exkréciós sebességet. Továbbá megállapítottuk, hogy az endogén T szint jelentősen befolyásolja az ip beadott szteroid turnoverének alakulását, amely mind vérplazmában lévő, mind pedig a bélsárban ürített hormontartalom alakulásában kimutatható volt. A vizsgálatok során felmerült metodikai kérdés, hogy az eltérő víztartalmú bélsárminták miként egalizálhatók. Bizonyítottuk, hogy a bélsár minták 37°C-on történő abszolút szárazra párlásával kiküszöbölhetők a mérési hibák.

A maternális stressz vizsgálatára két stresszort - egyrészt a handling, másrészt az éter-inhalációs stresszt - teszteltük mind a szülő-, mind az F1 és F2 generációkon.

Mindkét stresszornál, minden ismétlésnél és kombinációnál a kezeléseket követően egy rövid idejű tojástermelés visszaesés, ezzel párhuzamosan a tojástömeg növekedése volt megfigyelhető. A kelés eredményessége átlagosan 20%-kal maradt el a kontroll csoportétól, ami elsősorban a korai embrió elhalás emelkedéséből adódott.

A kezelt csoportokban a fiókák tömeges kelése átlagosan 12 órával megelőzte a kontroll csoportét. Ennek hátterében az általunk kimutatott szik androgén koncentráció-emelkedés állhat.

Az első handling stressz kísérletnél az életképes napos kacsák testtömege azonos volt a kontroll és a kezelt csoportban, de egyhetes korban a kezelt csoport utódai szignifikánsan kisebbek voltak, mint a kontroll társaik. Az éter stressz hatására már a kikeléskori testtömeg is alacsonyabb volt. Az alacsonyabb testtömeg a juvenilis vedlés (8. élethét) kezdetéig maradt meg, ezt követően a stresszelt csoport utódai gyorsabban és többnyire egyszerre fejezték be a vedlésüket, aminek hátterében a magasabb T koncentráció állhat.

Az F2 generációban sem az éter-, sem a handling stressz okozta testtömeg-csökkenést nem tudtuk igazolni. Vizsgáltuk a stressz kezelések által indukált szteroid koncentráció-változásokat a tojók bélsármintáiban, tojásszikben, valamint a juvenilis madarak vérplazmájában. Mindkét kezelés esetében emelkedett fekális B szint, P4 és androgén (T és DHEA) koncentráció volt kimutatható. Összehasonlítottuk az F1 generáció két kontroll csoportját is, itt a fekális alap B szintben nem találtunk különbséget, viszont a T, DHEA és P4 szintek esetében magasabb bazális értékeket kaptunk. A handling stressz kezelést kapott tojók utódainak ivarérése 6 héttel később következett be.

A 84 óra hosszat inkubált tojásokban lévő embriók genetikai ivarát meghatároztuk és ivar szerint értékeltük a tojásszikben kimutatható hormon koncentrációkat. A szikben is igazolható volt a B emelkedés. A vérplazmában, illetve bélsárban mért magasabb glükokortikoid koncentráció összefüggésben állt a szikben található magasabb értékkel. A megnövekedett szik glükokortikoid koncentráció és a tojás tömegének emelkedése között közepes, illetve szoros összefüggést találtunk (r=+0.60-+0.80). Megállapítottuk, hogy az elhalt embriókat tartalmazó tojásokban a magas B koncentráció a tojás tömegének növekedésével párosult.

A stressz hatására a tojásszikben megemelkedett tesztoszteron szintet is mértünk. A magasabb androgén szintnek szerepe lehet egyrészt az inkubációs idő csökkentésében, másrészt az utódok intenzívebb testtömeg-gyarapodásában.

A szik szteroid koncentrációkat összehasonlítottuk az F1 generáció két kontroll csoportjában is. A stresszelt tojóktól származó utódok tojásszik T szintjében szignifikánsan magasabb értéket találtunk, tehát az embrionális korban magasabb T koncentrációnak kitett tojók utódaiban is magasabb az alap T szint.

A szekunder ivararány vizsgálata szerint a stressz kezelések hatására nőtt a hímivarú utódok száma.

Eredményeinket összefoglalva elmondhatjuk, hogy a tojót ért stressz befolyásolja a tojástermelést, kelést, a tojásméretet, valamint az utódok embrionális és posztnatális fejlődését, mellyel újabb bizonyítékát adtuk az anyai epigenetikus hatás fontosságának az ovipara állatokban. Igazoltuk, hogy a tojó szteroid allokációk révén képes befolyásolni utódai embrionális és posztembrionális fejlődését és „életrevalóságát”.

7. SUMMARY

The different environmental effects exerted on the laying bird facilitate adaptive preparation and conversion of the offspring's metabolism. This can only be achieved through a 'flexible', rapidly modulable, epigenetic information transfer. The key questions of our investigations were as follow: What strategy can the laying bird employ for the protection of her offspring under suboptimal conditions? Do steroids have any role whatsoever in this process? We tried to answer the above questions by the use of an experimental model applying stressors. In our studies, we evaluated the stress effects exerted by the so-called 'handling' stress of neurogenic character and ether treatment of physical nature on the laying bird as well as on the perinatal development of the embryo and the postnatal development of the offspring.

We conducted our experiments in the Laboratory of Reproductive Biology of Szent István University in Gödöllő and in the experimental test houses of the laboratory. The species used in the experiment was the semi-domesticated mallard (*Anas plathyrhynchos*).

To lay the foundations for the experiments, in the first step we developed a reliable, simplified egg yolk extraction method, then we optimised the subsequent steroid analysis. On the basis of our findings, extraction with diethyl ether complemented with Triton-X-100 emulsification as pretreatment proved to be the most efficient method.

In the second step, we sought answer to the question from which day of the incubation can steroid production of the mallard embryo and the utilisation of steroid hormones be taken into consideration to obtain a realistic picture on the concentration of steroids of maternal origin. The testosterone (T) and 17-β-oestradiol (E2) concentrations of the yolk do not show drastic changes until day 4, while the corticosterone level (B) decreased at a uniform rate up to incubation day 8. Thus, the 84-hour incubation used by us proved to be suitable for determining the maternal investment.

In the third step, we considered it expedient to demonstrate that the known diurnal variation of plasma T level applies to the faeces as well. For this, we had to study the intestinal transit time of feed in both sexes in the sexually active and inactive period alike. We stated that the transit time of feed is sex and season dependent. We were the first to describe that the speed of excretion is sex dependent. In addition, we established that the endogenous T level markedly influences the turnover of intraperitoneally administered steroid, which was demonstrable both in the hormone levels of the blood plasma and in the hormone amounts excreted in the faeces. A methodological question arising during the studies was how faecal samples of different water content can be equalised. We proved that measurement errors can be eliminated by evaporating the faecal samples to absolute dryness at 37 °C.

For studying the maternal stress, we tested two stressors – the handling stress and the ether inhalation stress – both on the parental generation and on the F1 and F2 generations.

In the case of both stressors, for all replications and combinations a short-lasting drop of egg production occurred after the treatments, parallel with an increase of the egg mass. The hatching rate was, in average, 20% lower than in the control group, which was primary attributable to the elevated early embryonic mortality.

In the treated group, the mass hatching of nestlings took place in average 12 hours earlier than in the control group. This phenomenon might be due to the elevation of yolk androgen concentration demonstrated by us.

In the first handling stress experiment the body mass of viable day-old mallards was identical in the control and treated groups; however, at one week of age the offspring of the treated group were significantly smaller than those of the control group. As a result of the ether inhalation stress, the body mass of the offspring was lower already at the time of hatching. This lower body mass was maintained up to the onset of the first juvenile moult (8th week of life); subsequently the offspring of the stress-exposed group completed their moult more rapidly and mostly simultaneously, probably as a result of the higher T concentration.

In the F2 generation, we could not demonstrate a body mass reduction as a result of either the ether inhalation or the handling stress. We studied the steroid concentration changes induced by the stress treatments in the faecal samples of the layers, in the egg yolk and in the blood plasma of the juvenile birds. Both treatments resulted in elevated faecal B level as well as P4 and androgen (T and DHEA) concentrations. We also compared the two control groups of the F1 generation: here we did not find a difference in the basal faecal B level but obtained higher basal T, DHEA and P4 levels. The progeny of laying birds exposed to handling stress reached sexual maturity 6 weeks later.

We determined the genetic sex of embryos in the eggs incubated for 84 hours, and evaluated the hormone concentrations detectable in the egg yolk according to sex. Elevation of the B level could be demonstrated in the yolk as well. The higher glucocorticoid concentrations measured in the blood plasma and faeces were correlated with the higher value found in the yolk. There was a moderate to close correlation between the elevated glucocorticoid concentration and the increased egg weight ($r=+0.60–+0.80$). We established that in the eggs containing dead embryos the high B concentration was associated with the increase of egg weight.

As a result of stress, elevated testosterone level was measured in the egg yolk. The higher androgen level also may have a role in the reduction of the incubation time and in the more intensive body mass gain of the offspring.

We compared the yolk steroid concentrations also in the two control groups of the F1 generation. The egg yolk T levels of the offspring of the stress-exposed laying birds were

significantly higher; thus, the progeny of laying birds exposed to a higher T concentration at embryonic age also have a higher basal T level.

According to the results of investigations on the secondary sex ratio, the stress treatments increased the number of male offspring.

Summarising our results, we can state that exposure of the laying bird to stress influences egg production, hatching, egg size and embryonic and postnatal development of the offspring. This furnishes further evidence of the importance of maternal epigenetic effect in oviparous animals. We have proved that the laying bird can influence the embryonic and postembryonic development and 'viability' of her offspring through steroid allocations.

8. AZ ÉRTEKEZÉS TÉMAKÖRÉHEZ KAPCSOLÓDÓ PUBLIKÁCIÓK

Impakt faktoros, idegen nyelvű közlemények:

Szőke Zs., Váradi É., Kelemen K., Biczó A., Péczely P (2006): Effect of testosterone loading on the kinetic of faecal testosterone excretion in mallards Acta Biol. Hung 57 (1): 13-21. *IF: 0.688*

Szőke Zs., Váradi É., Végi B., Péczely P., Barna J. (2006): Effect of sexual and seasonal differences in faecal steroid analysis in birds: optimalization of sample collection. XII. European Poultry Conference, 10-14. 09. 2006. Verona, Italy. World's Poultry Science Journal 62 (supplement): 515. *IF: 1.117*

Kelemen, K., Péczely, P., **Szőke, Zs,** Ladjánszky, V. (2003): A comparative methodical study of the fecal steroid analysis on birds: looking for a valid method of testosterone determination. Acta Biol. Hung. 54.(3-4) 285-98. *IF: 0.309*

Do thi Dong, X., Végi, B., **Szőke, Zs**., Péczely, P. (2005): Seasonal changes in plasma dehydroepiandrosterone (DHEA) levels of domestic geese. Acta Biol. Hung 56(1-2):11-20. *IF: 0,636*

Lektorált, idegen nyelvű közlemény:

Szőke, Zs., Végi, B., Varga, Á., Lennert, L., Péczely, P. and Barna, J. (2006): Effects of artificial insemination as a handling stress on egg weight, yolk corticosterone content and embryonic mortality (Pilot study) In: New insights into fundamental physiology and perinatal adaptation of domestic fowl. Conference Issue. Eds: S Yahav and B. Tzscheentke. Nottingham University Press. pp. 189-197.

Lektorált folyóiratban megjelent magyar nyelvű közlemények:

Szőke Zs., Ferenczi Sz., Ádám D., Biczó A., Péczely P.(2003): Maternális stressz hatása a szikbe deponált szteroidokra és az utódok szomatikus tulajdonságaira tőkés récében (*Anas plathyrynchos*) Állattenyésztés és Takarmányozás 52(2): 180-188.

Szőke Zs., Ferenczi Sz., Biczó A., Péczely P. (2005): A tojót ért stressz hatása a tojásszikbe deponált szteroidokra és utódaira. Állattenyésztés és Takarmányozás 54(3): 255-264

Biczó A., **Szőke Zs**., Péczely P. (2003): A gyöngytyúk (*Numida meleagris*) vérplazma és faeces szexuálszteroid paramétereinek vizsgálata. Állattenyésztés és Takarmányozás 52(2): 189-194

Szőke Zs., Végi B., Varga Á., Lennert L., Péczely P., Barna J. (2006): Tyúk mesterséges termékenyítésről, másképp. Állattenyésztés és Takarmányozás. 55 (5): 483-491.

Váradi É., **Szőke Zs**., Végi B., Péczely P., Barna J. (2008): A kakascsere mint stresszor endokrinológiai elemzése hústípusú szülőpárállományban. AWETH Vol. 4 (Különszám): 381-390.

Nemzetközi konferencia proceedings-ben megjelent közlemények:

Szőke, Zs. , Ferenczi, Sz., Biczó, A., Péczely, P. (2004): Effect of maternal handling stress on the steroid deposition into the yolk and on the offspring Proc. 8th International Symposium on Avian Endocrinology, Phoenix AZ, USA, P78. *http://lsweb.la.asu.edu/isae/isae_program%20.html*

Szőke, Zs., Biczó, A., Péczely, P. (2004): Effect of handling stress on the egg production and some egg-parameters. Proc. 8th International Symposium on Avian Endocrinology, Phoenix AZ, USA, P77. *http://lsweb.la.asu.edu/isae/isae_program%20.html*

Szőke, Zs., Váradi, É., Kelemen, K., Péczely, P. (2004): Effect of testosterone loading on the kinetic of fecal testosterone excretion in mallards. Proc. 8th International Symposium on Avian Endocrinology, Phoenix AZ, USA, P79. *http://lsweb.la.asu.edu/isae/isae_program%20.html*

Szőke, Zs, Végi, B., Varga, Á., Lennert, L, Péczely P., Barna J (2005): Effects of artificial insemination – as a handling stress – on the early embryonic mortality and the yolk corticosterone content Fourth Hungarian-Vietnamese Symposium on Cooperation in Sustainable Animal Production and Aquaculture: Results and Prospects *Gödöllő – Szarvas, Hungary, 24-27. 10. 2005. Előadás*

Péczely, P., Ladjánszky, V., Biczó, A., **Szőke, Zs**., Pintér, O., Kelemen, K., Végi, B.(2004): Dehydroepiandrosterone (DHEA): it's possible role in the avian annual cycles Proc. 8th International Symposium on Avian Endocrinology, Phoenix AZ, USA, P57. *http://lsweb.la.asu.edu/isae/isae_program%20.html*

Biczó, A., **Szőke, Zs**., Nyéki, B., Péczely, P. (2003): Effects of handling stress on the kinetics of sexualsteroids and corticosterone in Guinea hens (*Numida meleagris*) 4th International conference of PhD students, Miskolc 11-17. August, Proceedings Agriculture: pp. 9-14.

Biczó, A., **Szőke, Zs**., Péczely, P. (2004): Sexualsteroid parameters of plasma and faeces in guinea fowl *(Numida meleagris)* during sexual maturation Proc. 8th International Symposium on Avian Endocrinology, Phoenix AZ, USA, P5. *http://lsweb.la.asu.edu/isae/isae_program%20.html*

Biczó, A., **Szőke, Zs**., Péczely, P. (2004): Effects of handling and ether inhalation on the steroidal and reproductive parameters of guinea hens (*Numida meleagris*). Proc. 22nd World's Poultry Congress, Istanbul, Turkey, Poster M3-16. 1330. p.

Hazai konferencia proceedings-ben megjelent közlemények:

Szőke Zs., Ferenczi Sz., Ádám D., Biczó A., Péczely P. (2002): A maternális stressz hatása a tőkés réce (*Anas plathyrynchos*) néhány szaporodásbiológiai paraméterére 9. Szaporodásbiológiai Találkozó, Balatonfüred 2002. november 8-9. p. 11.

Szőke Zs., Biczó A., Barna J. Péczely P. (2005) Szteroidhormonok tojásszikből történő meghatározása, mint a stresszhatások és az "anyai befektetés" diagnosztikai lehetősége madarakban. Proc. "Vadállatok szaporodásbiológiája, állatkerti tenyészprogramok" konferencia, Budapest, 2005. Márc. 18-20. pp.

Ferenczíné Szőke Zs. (2005): Tojásba deponált hormonok utódokra gyakorolt hatása. 74. OMÉK, Agrárkutatás 2005, Fiatal Kutatók Fóruma

Szőke Zs, Végi B., Péczely P., Barna J (2006): A tojásszikbe deponált szteroidok szerepe, mint anyai hatás, különböző tojásrakó gerincesekben 13. Szaporodásbiológiai Találkozó és Nemzetközi Szimpózium, Budapest, 2006. 06. 26-27. 30. p.

Biczó A., **Szőke Zs.,** Péczely P (2004): Handling stressz és éter-inhaláció hatásai Gyöngyös tojók endokrin és szaporodási paramétereire. In: Összefoglalók, X. Ifjúsági Tudományos Fórum, Keszthely, 2004. április 29. [CD:/Allatelettan_Takarmanyozastan/204.pdf]

Váradi É., **Szőke Zs**., Péczely P., Végi B., Barna J. (2007): A kakascsere okozta stressz hatásának endokrinológiai elemzése fekális szteroid-analízissel hústípusú szülőpárállományban. 14. Szaporodásbiológiai Találkozó, Keszthely, 2007. október 5-6. p. 41.

9. FELHASZNÁLT IRODALOM

1. **Abraham, G.E., Swerdloff, R., Tulcinsky, D. and Odell, W.D.** (1971): Radioimmunoassay of plasma progesterone. Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism 32: 619-624.
2. **Appleby M.C. and Hughes, B.O.** (1990): Cages modified with perches and nests for the improvement of bird welfare. World's Poultry Sci. J. 46(1): 38-40.
3. **Arcos, M.** (1972): Steroids in egg yolk. *Steroids* **19:,** 25-34.
4. **Badyaev, A.V., Schwabl, H., Young, R.L., Duckworth, R.A., Navara, K.J., Parlow, A.F.** (2005):. Adaptive sex differences in growth of pre-ovulation oocytes in a passerine bird. Proc. R. Soc. London, Ser. B Biol. Sci. 272: 2165–2172.
5. **Bahr, J.M.,Wang, S.-C., Huang, M. Y., and Calvo, F. O.** (1983): Steroid concentrations in isolated theca and granulosa layers of preovulatory follicles during the ovulatory cycle of the domestic hen. Biol.Reprod. 29: 326–334.
6. **Becze J.** (1981): A nőivarú állatok szaporodásbiológiája. Mezőgazdasági Kiadó, Budapest, 102-103.
7. **Bell, D.D.** (1995): A cage study with laying hens. Proc. of Animal Behavior and the Design of livestock and Poultry Conf. Northeast Regional Agricultural Service, NRAES-84, 307-319.
8. **Biczó,A., Tarcsai,G., Kelemen,K., Péczely,P.** (2000): Relationship between faecal sexual steroid content and intensity of display behaviour of male great bustard. (Otis tarda) VII. International Symposium on Avian Endocrinology 11,11
9. **Biczó A., Szőke Zs., Nyéki B. Péczely P.** (2003): Effects of handling stress on the kinetics of sexualsteroids and corticosterone in Guinea hens (Numida meleagris) 4th International conference of PhD students, Miskolc 11-17. August, Proceedings Agriculture: 9-14.
10. **Biczó A., Szőke Zs., Péczely P** (2004): Handling stressz és éter-inhaláció hatásai Gyöngyös tojók endokrin és szaporodási paramétereire.
    In: Összefoglalók, X. Ifjúsági Tudományos Fórum, Keszthely, 2004. április 29. [CD:/Allatelettan_Takarmanyozastan/204.pdf]
11. **Biczó, A. and Péczely, P.** (2007): Display activity and seasonality of faecal sexual steroids in male great bustard (Otis tarda L.). Acta Biol. Hung., 58(1):21-33.
12. **Bishop, C.M., Hall, M.R.** (1991) Non-invasing monitoring of avian reproduction by simplified fecal steroid analysis. J. Zool. London, 224, 649-668.
13. **Chainy, G. B., Samantaray, S. & Samanta, L.** (1997): Testosterone-induced changes in testicular antioxidant system. Andrologia, 29: 343-349.
14. **Cockrem, J.F., Rounce,J.R.** (1994) Fecal measurements of oestradiol and testosterone allowed non-invasive estimation of plasma steroid concentrations in domestic fowl. British Poultry Sci., 35, 433-443.
15. **Cree, A., Tyrrell, C.L., Preest, M.R., Thorburn, D., Guillette, L.J. J**r (2003): Protecting embryos from stress: corticosterone effects and corticosterone response to capture and confinement during pregnancy in a live-bearing lizard (*Hoplodactylus maculatus).* Gen. Comp. Endocrinol. 134: 316-329.
16. **Creel, S.** (2001): Social dominance and stress hormones. Trends in Ecology&Evolution 16(9): 491-497.
17. **Cunningham, E.J.; Russell, A.F.** (2000): Egg investment is influenced by male attractiveness in the mallard. Nature 404: 74-77.
18. **Da Silva, J. A. P**. (1999): Sex hormones and glucocorticoids: interactions with the immune system. Annuals of the New York Academy of Sciences, 876:102-118.
19. **Dansky L.M., Hill, F. W. (**1952): Application of the chromic oxide indicator method to balance studies with growing chickens. J. Nutr. 47(3):449-59.
20. **de Fraipont, M., Colbert, J., John-Adler, H. Meylan S** (2000): Increased prenatal corticosterone promotes philopatry of offspring in common lizard (*Lacerta vivipara*). J. Anim. Ecol. 69: 404-431.

21. **DeNardo, D. F. and Sinervo, B.** (1994): Effects of Steroid Hormone Interaction on Activity and Home-Range Size of Male Lizards Horm Behav 28(3): 273-287.
22. **Denbow M** (2000): Gastrointestinal Anatomy and Physiology Chapter 12. In Whittow, C. G (ed.) Sturkie's Avian Physiology pp. 299-325.
23. **Eising, C.- Eikenaar, C.-Schwabl, H.-Groothuis, TGG** (2001): Maternal androgens in black-headed gull (*Larus ridibundus*) eggs: consequences for chick development. Proc.R. Soc. Lond. 268: 839-846.
24. **Eising, C. M., Müller, W., Dijkstra, C. & Groothuis,T. G.** (2003a.): Maternal androgens in egg yolks: relation with sex, incubation time and embryonic growth. Gen. Comp. Endocrinology,132: 241-247.
25. **Eising, C. M., Visser, G. H., Müller, W. & Groothuis,T. G. G.**(2003b): Steroids for free? No metabolic costs of elevated maternal androgen levels in the black-headed gull. Journal of Experimental Biology, 206: 3211-3218.
26. **Eising, C.M. and Groothuis, T.G.G.** (2002): Long-term effects of maternal yolk androgens: an experimental approach. ISBE 2002, Abstracts, 35-36.
27. **Elf, P.K. and Fivizzani, A.J.** (2002): Changes in sex steroid levels in yolks of the Leghorn chicken, *Gallus domesticus*, during embryonic development. J. Exp. Zoology, 293: 594-600.
28. **Ellegren, H.L., Gustafsson, L. and Sheldon, B.C.** (1996): Sex ration adjustment in relation to paternal attractiveness in a wild bird population. Proceedings of the National Academy of Sciences, U.S.A. 93: 11723-11728.
29. **Ellis LA, Borst DW, Thompson CF.** (2001): Hatching asynchrony and maternal androgens in egg yolks of house wrens. J Avian Biol; 32:26–30.
30. **Eriksen, M.S., Haug, A., Torjesen, P.A., Bakken, M.** (2003): Prenatal exposure to corticosterone impairs embryonic develpoment and increases fluctuating asymmetry in chickens (*Gallus gallus domesticus*). Br. Poult. Sci. 44: 690-697.
31. **Etches, R.** (1996): Reproduction in Poultry. CAB International, Wallingford
32. **Faucounau, N., Ichas, F., Stoll, R., Maraud, R.** (1995): Action of testosterone on the estradiol-induced feminization of the male chick embryo. Anat. Embryol. 191: 377-379.
33. **Ferree, ED, Wikelski, MC, Anderson DJ** (2004): Hormonal correlates of siblicide in Nazca boobies: support for the Challenge Hypothesis. Horm Behav. 46(5):655-662.
34. **Folstad, I. & Karter, A. J.** (1992). Parasites, brightmales, and the immunocompetence handicap. American Naturalist, 139: 603-622.
35. **Forgó V, Afanasiev, GD.**, **Péczely P.** (1988b): Structural and hormonal changes during follicular maturation in the ovary of the domestic goose. Acta Biol Hung. 39(4):403-17.
36. **Forgó V, Sass M.**, **Péczely P.** (1988a): Light microscopic, enzyme biochemical and steroid analytical investigations of follicular atresia in the ovary of domestic goose. Acta Biol Hung. 39(4):377-401.
37. **French Jr. JB, Nisbet ICT, Schwabl H.**(2001): Maternal steroids and contaminants in common tern eggs: a mechanism of endocrine disruption? Comp Biochem Physiol; 128:91–8.
38. **Galbraith, H.** (1988): Effects of egg size and composition on the size, quality and survival of Lapwing *Vanellus vanellus* chicks. Journal of Zoology (London) 214:383–398.
39. **Garamszegi, L.Z, Török J., Tóth, L. Michl, G** (2004) Effect of timing and female quality on clutch size in the Collared Flycatcher *Ficedula albicollis*. Bird Study 51:270–277.
40. **Garde, AH., Hansen, AM., Skovgaard, LT., Christensen, JM** (2000): Seasonal and biological variation of blood concentrations of total cholesterol, dehydroepiandrosterone sulfate, hemoglobin A(1c), IgA, prolactin, and free testosterone in healthy womenClin Chem. 46(4):551-559.
41. **Gil D, Graves J, Hazon N, Wells A.** (1999): Male attractiveness and differential testosterone investment in zebra finch eggs. Science; 286:126–8.
42. **Gil, D** (2003): Golden eggs: Maternal manipulation of offspring phenotype by androgen in birds. Ardeola 50(2): 281-294.

43. **Gil, D., Leboucher, G., Lacroix, A., Cue, R. and Kreutzer, M.** (2004): Female canaries produce eggs with greater amounts of testosterone when exposed to preferred male song. Horm. and Behavior 45: 64-70.
44. **Gil, D., Ninni, P., Lacroix, A., De Lope, F., Tirard,C., Marzal, A. & Møller, A. P.** (2006): Yolk androgens in the barn swallow (*Hirundo rustica*): a test of adaptive hypotheses. J. Evol Biol. 19:123-131
45. **Gilbert, L., Bulmer, E., Arnold, K.E, Graves J.A.** (2007): Yolk androgens and embryo sex: Maternal effects or confounding factors? Horm. and Behavior 51: 231–238.
46. **Goodson, JL.**, **Saldanha, CJ., Hahn, TP., Soma, KK.** (2005): Recent advances in behavioral neuroendocrinology: insights from studies on birds. Horm Behav. 48(4):461-73.
47. **Hackl, R, Bromundt, V.**, **Daisley, J. Kotrschal, K., Möstl, E** (2003): Distribution and origin of steroid hormones in the yolk of Japanese quail (*Coturnix japononica japonica*) J. of Comp. Physiol. B, 173: 327-331.
48. **Hargitai, R, Török, J, Tóth, L., Hegyi, G, Rosivall, B., Szigeti, B, Szöllősi, E.** (2005): Effects os environmental conditions and parental quality on inter-and intraclutch egg-size variation in collared flycatcher (*Ficedula albicollis*). Auk 122(2): 509-522.
49. **Haskell, D.** (1994): Experimental evidence that nestling begging behaviour incurs a cost due to nest predation. Proc. R Soc London, Series B, 257: 161-164.
50. **Hau, M., Stoddard, ST., Soma KK** (2004): Territorial aggression and hormones during the non-breeding season in a tropical bird. Horm Behav. 45(1):40-49.
51. **Hayashi, A, Nagaoka, M, Kazuo, Y, Ichitani, Y., Miake, Y, Okado, N** (1998): Maternal stress induces synaptic loss and developmental disabilities of offspring Int. J. Devl. Neuroscience 16: 209-216
52. **Hayward, L., Satterlee, D.G., Wingfield, J.C.** (2005): Japanese quail selected for high plasma corticosterone response high levels of corticosterone in their eggs. Physiol. Biochem. Zool. 78(6): 1026-31.
53. **Hayward, L.S. and Wingfield, J.C.** (2004): Maternal corticosterone is transferred to avian yolk and may alter offspring growth and adult phenotype. Gen. Comp. Endorinol. 135(3): 365-71.
54. **Hayward, LS, Richardson, JB, Grogan, MN, Wingfield, JC** (2006): Sex differences in the organizational effects of corticosterone in the egg yolk of quail. Gen Comp Endocrin 146: 144–148
55. **Hendrix Poultry Breeders Company** (2004): Controlling egg size. In: Technical Info Bulletin. *www.hendrix-poulry.nl*
56. **Herrenkohl, L.R.** (1979): Prenatal stress reduces fertility and fecundity in female offspring. Science 206: 1097-1099.
57. **Hertelendy, F. & Common, R. H.** (1965): A chromatographic investigation of egg yolk for the presence of steroid estrogens. Poultry Science **44:** 1205-1209.
58. **Hirschenhauser, K., Möstl, E., Péczely,P., Wallner, B., Kotrschal, K.** (2000b) Seasonal relationships between plasma and fecal testosterone in response to GnRH in domestic ganders. Gen. Comp. Endocr., 118, 262-272.
59. **Hõrak, P., Mänd, R, Ots, I., Leivits, A**. (1995): Egg size in the Great Tit *Parus major*: Individual, habitat and geographic differences.Ornis Fennica 72:97–114.
60. **Hörnfeldt B., Hipkiss T, Fridolfsson A.-K., Eklund U. and Ellegren H.** (2000): Sex ratio and fledging success of supplementary-fed Tengmalm's owl broods. Molecular Ecology 9, 187-192.
61. **Hu Y, Cardounel A, Gursoy E, Anderson P, Kalimi M.** (2000) Anti-stress effects of dehydroepiandrosterone: protection of rats against repeated immobilization stress-induced weight loss, glucocorticoid receptor production, and lipid peroxidation. Biochem Pharmacol. 59(7):753-762.
62. **Huang, ES-R., Kao, KJ., Nalbandov, AV.** (1979): Synthesis of sex steroids by cellular components of chicken follicles. Biol. Reprod. 20: 442-453.

63. **Itoh, Y., Suzuki, M., Ogawa, I., Munechika, K., Murata, K., and Mizuno, S.** (2001): Identification of the sex of wide range of Carinatae birds by PCR using primer sets selected from chicken EE0.6 and its related sequences. The Am. Genetic Association 92:315-321.
64. **Jallageas, M.** (1975): Interactions reciproques testo-thyroidiennes chez le Canard male. Indcidenés sur les cycles endocriniens annuels. These, Université de Montepelier, France.
65. **Janczak A.M, Braastad B.O. and Bakken M** (2006): Behavioural effects of embryonic exposure to corticosterone in chickens Applied Animal Behaviour Science, *96: 69-82*
66. **Järvinen, A.** (1991): Proximate factors affecting egg volume in subarctic hole-nesting passerines.Ornis Fennica 68:99–104.
67. **Jennings DH**, **Painter DL**, **Moore MC** (2004): Role of the adrenal gland in early post-hatching differentiation of alternative male phenotypes in the tree lezard (Urosaurus ornatus). Gen Comp Endocrinol. 135(1):81-9
68. **Kaiser, S., Sachser, N.** (2001) Social stress during pregnancy and lactation affects in guinea pigs the male offspring' endocrine status and infantilizes the behaviour. Psychoneuroendocrinology 5: 503-519
69. **Kato, M., Shimada, K., Saito, N., Noda, K. Ohta, M.** (1995): Expression of P450 $_{17\text{-}\alpha\text{-hydroxylase}}$ and P450 $_{\text{aromatase}}$ genes in isolated granulosa, theca interna, and theca externa layers of chicken ovarian follicles during follicular growth. Biol. Reprod. 52: 405-410.
70. **Kelemen, K, Péczely, P, Szőke, Zs, Ladjánszky, V.** (2003): A comparative methodical study of the faecal steroid analysis on birds: looking for a valid method of testosterone determination. Acta Biol. Hung. 54.(3-4) 285-98.
71. **Kitaysky, A.S., Wingfield, J.C., Piatt, J.F.** (2001): Corticosterone facilitates begging and affects resource allocation in black-legged kittiwake. Behav. Ecol. 12:619-625.
72. **Kofman O**. (2002) The role of prenatal stress in the etiology of developmental behavioural disorders Neuroscience and Biobehavioral Reviews 26: 457-470
73. **Kovács, K.J., and Péczely, P.** (1991): Plasma adrenocorticotropin in domestic geese: Effect of ether stress and endocrine manipulations. Gen. Comp. Endocr., 84:192-198.
74. **Lagadic, H., Faure, J.M., Mills, A.D., Williams, J.B.** (1990): Effect of blood sampling on plasma concentrations of corticosterone and glucose in laying hens caged in groups. Br. Poultry Sci. 31: 823-829.
75. **Lay Jr., D.C., Wilson, M.E.** (2002): Development of the chicken as a model for prenatal stress. J. Anim. Sci. 80: 1954-1961.
76. **Lipar JL, Ketterson ED, Nolan V** (1999a): Intra-clutch variation in testosterone contents of red-winged blackbirds eggs. Auk;116:231–235.
77. **Lipar, J. L. & Ketterson, E. D.** (2000): Maternally derived yolk testosterone enhances the development of the hatching muscle in the red-winged blackbird *Agelaius phoeniceus*. Proc. Royal Society of London, Series B, 267: 2005-2010.
78. **Lipar, J.L., Ketterson, E.D, Nolan, V. & Casto, J. M.** (1999b): Egg yolk layers vary in the concentration of steroid hormones in two avian species. Gen. Comp. Endocrinol., 115: 220-227.
79. **Lipar, JL** (2001): Yolk steroids and the development of the hatching muscle in nestling European Starlings. J. Avian Biol. 32: 231-238.
80. **Lou, H.C., Hansen, D., Nordentoft, M., Pryds, O.M., Jensen, F, Nim, J. Hemmingsen, R.** (1994): Prenatal stressors of human life affect fetal brain development. Dev. Med. Child. Neurol. 26: 826-832
81. **Love, O.P., Chin, E.H., Wynne-Edwards, K.E., Williams, T.D., (**2005): Stress Hormones: a link between maternal condition and sex-based reproductive investment. Am. Nature. 166, 751–756.
82. **Magrath,** (1992): Seasonal changes in eggmass within and among clutches of birds: General explanations and a field study of the blackbird *Turdus merula*. Ibis 134:171–179.
83. **Mazuc J, Chastel O, Sorci G.**(2002): No evidence for differential maternal allocation to offspring in the house sparrow (Passer domesticus). Behav Ecol; 14:340–6.

84. **McCormick MI** (1999): Experimental test of the effect of maternal hormones on larval quality of coral reef fish. Oecologia. 118, 412-42**2**
85. **McIntosh M, Bao H, Lee C.** (1999) Opposing actions of dehydroepiandrosterone and corticosterone in rats. Proc Soc Exp Biol Med. 221(3):198-206.
86. **McNabb, F. M. A. & Wilson, C. M.** (1997): Thyroid hormone deposition in avian eggs and effects on embryonic development. American Zoologist, **37:**553-56
87. **Meijer, T.** (1992): Egg-laying patterns in capative starlings. *Ardea* **80:** 301-310.
88. **Mesiano S, Katz SL, Lee JY, Jaffe RB.(**1999): Phytoestrogens alter adrenocortical function: genistein and daidzein suppress glucocorticoid and stimulate androgen production by cultured adrenal cortical cells. J Clin Endocrinol Metab. 84(7):2443-2448.
89. **Meylan, S. and Colbert J.** (2005): Is corticosterone-mediated phenotype development adaptive? Maternal corticosterone treatment enhances survival in male lizards. Horm. Behav. 48: 44-52.
90. **Michl, G., Török J, Garamszegi L.Z, and Péczely P.** (2000): The hormonal background of sperm competition in male Collared Flycatcher (Aves). VII. International Endocrinological Congress, poster Abstract Book p. 150.
91. **Michl G, Török J, Griffith SC, Sheldon BC** (2002): Experimental analysis of sperm competition mechanisms in a wild bird population. PNAS, 99(8):5466-70.
92. **Michl, G, Török, J., Péczely, P., Garamszegi, L. Schwabl, H.** (2004): Female collared flycatchers adjust yolk testosterone to male age, but not to attractiveness. Behavioral Ecology 16: 383-388.
93. **Mikhail, G., Wu, C.H., Ferin, M. and Vande Wiele, R.L**. (1970): Radioimmunoassay of plasma estrone and estradiol. Steroids 15: 333-352.
94. **Morgan MJ - Wilson, CE - Crim, LW** (1999): The effect of stress on reproduction in Atlantic cod. J. Fish Biol. 54, 477-488.
95. **Müller, W., Eising, C. M., Dijkstra, C. & Groothuis,T. G.** (2002): Sex differences in yolk hormones depend on maternal social status in Leghorn chickens (*Gallus gallus domesticus*). Proc. Royal Society of London, Series B, 269:2249-2255.
96. **Nelson, R. J.** (2000): An Introduction to Behavioral Endocrinology. Sinauer. Sunderland.
97. **Nitta, H., Osawa, K., Bahr, JM.** (1991): Multiple steroidogenic cells population in theca layer of preovulatory follicles of the chicken ovary. Endocrinology. 129: 2033-2040.
98. **Orth, DN., Kovács, WJ., DeBold, R.** (1992): The adrenal cortex. In. Williams Textbook of Endocrinology (J.D. Wilson, D.W. Foster eds) 8th edition, Saunders Co., Philadelphia, London, Toronto, Montreal, Sydney, Tokyo 489-619.
99. **Palme R, Rettenbacher, S., Hackl, R. Ghareeb, K., Möstl, E.** (2004): Nonivasive evaluation of adrenal activity in chicken Proc. 8th International Symposium on Avian Endocrinology, Phoenix AZ, USA, P55.
100. **Péczely, P.** (1972): Effect of ether stress on CRF-ACTH system of the domestic pigeon. Acta Biol. Acad. Sci. Hung. 23: 23-29.
101. **Péczely, P.** (1987): A madarak szaporodásbiológiája. Mezőgazda Kiadó, 80-90. old.
102. **Péczely, P., Pethes, Gy.** (1978): A pajzsmirigyhormonok és sexualsteroidok interrelácója nőstény japán fürjön. Magyar Élettani Társaság. XLIV. Vándorgyűlésének Előadáskivonatai, Debrecen 115-116.
103. **Péczely, P., Pethes, G.** (1981): Effect of ovariectomy, thyroidectomy and of thyroxine treatment on the plasma level of corticosterone of the female japanese quail. Acta Biol. Acad. Sci. Hung. 32, 1-6.
104. **Péczely, P., Kovács, K.** (1998) Effects of a fungicide (Vitavax 200FF) on the reproductive endocrine functions of mallard. Env. Toxicol. Water Qual. 13, 133–141.
105. **Perrins,C.M.** (1970): The timing of birds' breeding seasons. Ibis 112:242–255.
106. **Petrie, M., Williams, A**. (1993): Peahens lay more eggs for peacocks with larger trains. Proc R Soc London, B. 251:127-131.

107. **Petrie, M. Schwabl, H., Brande-Lavridsen, N., Burke, T.** (2001): Sex differences in avian yolk hormone levels, Nature, 412: 498-499
108. **Pierotti, R, Bellrose, C.M.** (1986): Proximate and ultimate causation of egg size and the "third-chick disadvantage" in the Western Gull. Auk 103:401–407.
109. **Pilz, K.M., Smith, H., Sandell, M.I. and Schwabl, H.** (2003): Interfemale variation in egg yolk androgen allocation in the European Starling: Do high-quality females invest more? Animal Behaviour 65: 841-850.
110. **Pilz, K.M.** (2003): Egg yolk androgens in the European starling (*Sturnus vulgaris*): Maternal allocation and offspring effects. Doktori értekezés, Cornell University, New York
111. **Pilz KM, Adkins-Regan E, Schwabl H.** (2005): No sex difference in yolk steroid concentrations of avian eggs at laying. Biol Lett. 1(3):318-21.
112. **Pike TW, Petrie M.** (2005): Offspring sex ratio is related to paternal train elaboration and yolk corticosterone in peafowl. Biol. Lett. 1(2):204-7
113. **Porter, TE., Hargis, BM., Silsby, JL., El Halawani, ME.** (1989): Differential steroid production between theca interna and theca externa cells: a tree-cell model for follicular steroidogenesis in avian species. Endocrinology. 125: 109-116.
114. **Pottinger, TG - Carrick TR** (2000): Indicators of reproductive performance in rainbow trout Oncorhynchus mykiss (Walbaum) selected for high and low responsiveness to stress. Aquac. Res. 31, 367-375.
115. **Razia, S.**, **Maegawa, Y., Tamotsu, S., Oishi, T**. (2006): Histological changes in immune and endocrine organs of quail embyos: Exposure to estrogen and nonylphenol. Ecotoxicol and Environ Saf..;65(3):364-71.
116. **Reed WL, Vleck CM.** (2001): Functional significance of variation in egg-yolk androgens in the American coot. Oecologia; 128:164–71.
117. **Rettenbacher, S.**, **Möstl, E.**, **Hackl, R, Palme, R.** (2005): Corticosterone in chicken eggs. Ann.N.Y. Acad. Sci. 1046: 193-203.
118. **Riddle, O. & Dunham, H.H.** (1942): Transformation of males to intersexes by estrogen passed from blood of ring doves to their ovarian eggs. Endocrinol. **30**: 959-968.
119. **Royle, N. J., Hartley, I. R., Owens, I. P. F. & Parker, G. A.** (1999): Sibling competition and the evolution of growth rates in birds. Proc R Soc London, Series B, 266: 923-932.
120. **Rubolini, D., Romano, M., Boncoraglio, G., Ferrari, R.P., Martinelli, R., Galeotti, P., Fasola, M, Saino N.** (2005): Effects of elevated egg corticosterone levels on behavior, growth, and immunity of yellow-legged gull (*Larus michahellis*) chicks. Horm. Behav. 47: 592-605.
121. **Rutstein AN, Gilbert L, Slater P, Graves J.** (2005): Sex-specific patterns of yolk androgen allocation depend on maternal diet in the zebra finch. Behav Ecol;16:62–9.
122. **Saino, N., Romano, M., Ferrari, RP., Martinelli, R., Møller, A. P.** (2005): Stressed mothers lay eggs with high corticosterone which produce low-quality offspring. J. Exp. Zoology A Comp Exp Biol. 303 (11): 998-1006.
123. **Saino, N., Suffritti, C., Martinelli, R., Rubolini,D. & Møller, A. P.** (2003): Immune response covaries with corticosterone plasma levels under experimentally stressful conditions in nestling barn swallows (*Hirundo rustica*). Behavioral Ecology,14: 318-325.
124. **Sasvári, L., Hegyi, Z., Péczely, P.** (1999): Brood reduction in white storks mediated through assymetries in plasma testosterone concentrations in chicks, Ethology, 105, 569-582.
125. **Sasvári, L., Hegyi, Z., Péczely, P.,** (2001): Reply to Ros, Hirschenhauser and Oliviera. Ethology, 107, 854-856.
126. **Schwabl H, Mock DW, Gieg JA.** (1997): A hormonal mechanism for parental favouritism. Nature; 386:231.
127. **Schwabl, H.** (1993): Yolk is a source of maternal testosterone for developing birds. Proc. Natl. Acad. Sci. Vol. 90: 11446-11450.
128. **Schwabl, H.** (1997): Maternal steroid hormones in the egg. In: S. Harvey & R. J. Etches (Eds): Perspectives in Avian Endocrinology, pp. 3-13. Journal of Endocrinology. Bristol.

129. **Seckl, J.R.** (2001): Glucocorticoid programming of the fetus; adult phenotypes and molecular mechanismus. Molecular and Cellular Endocrinology 185: 61-71.
130. **Shires, A., Thompson J.R, Turner, B.V., Kennedy, P.M, Goh, Y. K.** (1987): Rate of passage of corn-canola meal and corn-soybean meal diets through the gastrointestinal tract of broiler and white leghorn chickens. Poult. Sci. 66.,289-298.
131. **Smith, H.G, Ottoson, U., Ohlson, T** (1993): Interclutch variation in egg mass among Starlings *Sturnus vulgaris* reflects female condition. Ornis Scandinavica 24:311–316.
132. **Sockman, K. W. & Schwabl, H. (**2000): Yolk androgens reduce offspring survival. Proceedings of theRoyal Society of London, Series B, 267: 1451-1456.
133. **Sockman, K. W. & Schwabl, H**. (2001): Plasma corticosterone in nestling American kestrels: Effects of age, handling stress, yolk androgens, and body condition. Gen. Comp. Endocr,122: 205-212.
134. **Soma, KK, Alday, NA., Hau, M., Schlinger BA.** (2004): Dehydroepiandrosterone metabolism by 3beta-hydroxysteroid dehydrogenase/Delta5-Delta4 isomerase in adult zebra finch brain: sex difference and rapid effect of stress. Endocrinology. 145(4):1668-1677.
135. **Strasser, R - Schawbl, H.** (2000): Organizational effects of yolk testosterone in the house sparrow Society for Neuroscience Abstracts 26(1-2) No.115.5.
136. **Szőke, Zs** , **Ferenczi, Sz, Biczó, A, Péczely, P** (2004): A tojót ért stressz hatása a tojásszikbe deponált szteroidokra és utódaira. Állattenyésztés és Takarmányozás 54. (3): 255-264.
137. **Szőke, Zs**., **Biczó, A., Barna, J. Péczely, P.** (2005): Szteroidhormonok tojásszikbõl történõ meghatározása, mint a stresszhatások és az "anyai befektetés" diagnosztikai lehetősége madarakban. Proc. "Vadállatok szaporodásbiológiája, állatkerti tenyészprogramok" konferencia, Budapest, 2005. Márc. 18-20.
138. **Szőke, Zs., Végi, B., Varga, Á., Lennert, L., Péczely, P. and Barna, J.** (2006) Effects of artificial insemination as a handling stress on egg weight, yolk corticosterone content and embryonic mortality (Pilot study) In: New insights into fundamental physiology and perinatal adaptation of domestic fowl. Conference Issue. Eds: S Yahav and B. Tzscheentke. Nottingham University Press. pp. 189-197.
139. **Takahashi, L.K.** (1998): Prenatal stress: Consequences of glucocorticoids on hippocampal development and function Int. J. Devl. Neuroscience 16: 199-207
140. **Takahashi, L.K., Haglin. C., Kalin, N.H**. (1992): Prenatal stress potentiates stress-induced behavior and reduces the propensity to play in juvenile rats. Physiol. Behav. 51: 319-323.
141. **Tilly, JL., Johnson, AL.** (1990): Modulation of hen granulosa cell steroidogenesis and plasminogen activator-activity by transforming growth factor alpha. Growth Factors. 3: 246-255.
142. **Török J., Moskát C., Michl G. and Péczely P.** (2004): Common cuckoos (*Cuculus canorus*) lay eggs with larger yolk but not more testosterone than their great reed warbler (*Acrocephalus arundinaceus*) hosts. *Ethology Ecology & Evolution* 16: 271-277.
143. **Tschirren B, Richner H, Schwabl H.** (2004): Ectoparasite-modulated deposition of maternal androgens in great tit eggs. Proc R Soc Lond B;271:1370–5.
144. **Tsutsui, K., Ukena, K., Takase, M., Kohchi, C., Lea, R.W.** (1999): Neurosteroid biosynthesis in vertebrate brains. Comp. Biochem. Physiol. C. Pharmacol. Toxicol Endocrinol, 124: 121-129.
145. **Ukena, K., Matsumaga, M, Tsutsui, K.** (2000): Neurosteroidogenesis in the avian brain. Abstract VII. Intern. Symp. Avian Endocrinology, Varanasi, 11.04.O.
146. **Van den Bergh, B., Mulder, E.J.H., Mennes, M., Glover, V**. (2005): Antenatal maternal anxiety and stress and neurobehavioural development of the fetus and child: links and possible mechanism. A review Neuroscience and Biobehavioral Reviews 29: 237-258.
147. **Verboven, N., Monaghan, P., Evans, D. M., Schwabl, H., Evans, N., Whitelaw, C. & Nager, R. G.** (2003): Maternal condition, yolk androgens and offspring performance: a supplemental feeding experiment in the lesser black-backed gull (*Larus fuscus*). Proc Royal Society of London, Series B, 270: 2223-2232.

148. **Von Engelhardt, N., Dijkstra, C., Daan, S., Groothuis T.G.G.** (2004): Effects of 17-βestradiol treatment of female zebra finches on offspring sex ratio and survival. Horm. Behav. 45:306-313.
149. **Wadhwa, P.D:, Sandman, C.A., Porto, M., Dunkel-Schetter, C. Garite, T.J.** (1993): The association between the prenatal stress and infant birth weight and gestational age at birth: a prospective study. Am. J. Obstet. Gynecol., 169: 858-865.
150. **Walsh, PS, Metzger, DA, Higuchi, R.** (1991): Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. Biotechniques. 10: 506-513
151. **Ward BC, Nordeen EJ, Nordeen KW.** (2001): Anatomical and ontogenetic factors producing variation in HVc neuron number in zebra finches. Brain Res; 904:318–26.
152. **Ward I.L.** (1972): Prenatal stress feminizes and demasculinizes the behavior of males. Science. 175: 82-84.
153. **Weinstock, M, Poltyrev, T, Schorer-Apelbaum, D. Men, D. McCarty R** (1998): Effect of Prenatal Stress on Plasma Corticosterone and Catecholamines in Response to Footshock in Rats Physiology&Behavior 64:439-444.
154. **Weinstock, M.** (2001): Alterations induced by gestational stress in brain morphology and behaviour of the offspring Progress in Neurobiology 65: 427-451.
155. **Whittingham, L.A. and Schwabl, H**. (2002): Maternal testosterone in tree swallow eggs varies with female aggression. Animal Behaviour 63: 63-67.
156. **Whittingham, L.A., Dunn, P.O.** (2000): Offspring sex ratios in tree swallows: females in better condition produce more sons. Mol. Ecol. 9: 1123-1129.
157. **Williams, T.D.** (1993): Parental and first generation effects of exogenous 17-beta-estradiol on reproductive performance of zebra finches (*Taeniopygia guttata*). Horm. Behav. 35: 135-143.
158. **Williams, T.D., Reed, W.L. and Walzen, R.L**. (2001): Egg size variation: mechanisms and hormonal control. In A. Dawson& CM. Chaturvedi (eds.) Avian Endocrinology pp. 205-217.
159. **Young, R.L., Badyaev, A.V.** (2004): Evolution of sex-biased maternal effects in birds: 1. Sex-specific resource allocation among simultaneously growing oocytes. J. Evol. Biol. 17, 1355–1366.
160. **Zarrow, M.X., Greenman, D.L., Peters, L.E.** (1961): Inhibition of the bursa of Fabricius and stilbestrol stimulated oviduct of the domestic chick. Poultry Sci. 40: 87-93.

10. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönetet szeretnék mondani témavezetőmnek **Péczely Péter** professzor úrnak, aki minden lehetőséget megadott e téma kivitelezésére, s mindig szabad kezet engedett ötleteim megvalósításához, valamint kudarcainkkor építő kritikával segítette tovább a munkát.

Köszönet jár csoportvezetőmnek **Dr. Barna Juditnak** is, aki felettébb gondos, precizitásával segítette munkámat, lektorálta irományaimat és segített gyakorlati aspektusból nézni eredményeimet, valamint mindig biztatott, amikor mélyponton voltam.

Hasonlóképpen köszönöm kollégáimnak **Végi Barbarának**, **Váradi Évának**, **Ladjánszky Veronikának**, **Biczó Andrásnak** és **Pintér Ottónak** a kísérletekben nyújtott önzetlen segítségüket, akik akár nappal akár éjjel is segítettek a mintagyűjtésben, analízisekben, vagy akár a madarak ellátásában.

Köszönöm asszitensünknek, **Bara Sándornénak, Katinak** a kísérletek és analízisek kivitelezése alatt nyújtott sok-sok segítséget, illetve a folyamatos kávé-ellátást.

Köszönöm **Kelemen (Parragh) Katalinnak**, hogy a fekális szteroid analízisek felé irányította figyelmemet, és a sok-sok hasznos tanácsát.

Köszönöm **Ferenczi Szilamérnak**, egyrészt, mint kollégámnak az embrió szexálásban nyújtott segítségét, másrészt, mint férjemnek a támogatást és a sok biztatást.

Köszönöm **Ádám Dóra** és **Nyéki Balázs** TDK hallgatóknak a mintagyűjtésben és keltetésben nyújtott segítségüket.

Köszönet jár volt KÁTKI-s kollégáimnak is **Dr. Liptói Krisztinának**, **Dr. Varga Ákosnak** és **Lennert Lászlónénak, Lidának** az eredmények értékelésében nyújtott segítségükért.

Végezetül köszönöm az egész **Családomnak** a nyugodt hátteret és kisfiamnak, **Zalánnak**, aki elviselte, hogy a mami a „gép” előtt üljön, s ne vele játsszon.