

ÁLLATTENYÉSZTÉS és TAKARMÁNYOZÁS

2023. 72. 1

Alapítás éve: 1952

ÁLLATTENYÉSZTÉS – TARTÁS – TAKARMÁNYOZÁS



> Novel traits and breeding concerns in sheep, cattle and poultry

> Korszerű polimorfizmus vizsgálatok húshasznú galambokban

> Flow citometriás adatelemző szoftver alkalmazása

> Fermentált folyékony takarmányok szerepe a sertéshizlalásban

> Csökkentett nyersfehérjeszintű, probiotikummal kiegészített takarmányok etetése brojlercsirkével

TARTALOM - CONTENTS

<i>George Wanjala - Putri Kusuma Astuti - Zoltán Bagi - Péter Strausz - Szilvia Kusza: Livestock breeding for welfare, adaptation and sustainability: an overview of the novel traits and breeding concerns in sheep, dairy, beef and poultry (Állattenyésztés az állatjólét, az adaptáció és a fenntarthatóság érdekében: a juh-, a tejelő- és húsmarha, valamint a baromfi ágazat új jellemzőinek és tenyésztési vonatkozásainak áttekintése)</i>	<i>1</i>
<i>Kovács Barnabás Mihály - Nagy Szabolcs Tamás: Flow-CASA: motilitási paraméterek gyors, automatizált klaszteranalízise flow citometriás adatelemző szoftver alkalmazásával (Flow-CASA: fast, automated cluster analysis of motility parameters using a flow cytometric data analysis software).....</i>	<i>22</i>
<i>Strifler Patrik - Horváth Boglárka - Bencze-Nagy Jennifer - Such Nikoletta - Csitári Gábor - Dublicz Károly - Pál László: Csökkentett nyersfehérjesszintű, probiotikummal kiegészített takarmányok hatásai brojlercsirkék termelési eredményeire és bélegészségügyi jellemzőire (Effects of low protein diets and probiotic supplementation on the performance and gut health of broiler chickens)</i>	<i>29</i>
<i>Sipos Bórkka - Balog Katalin - Kusza Szilvia - Bagi Zoltán: Korszerű polimorfizmus vizsgálatok áttekintése a húshasznú galambok termelési mutatóinak vizsgálatára és értékelésére (Overview of modern polymorphism studies for the examination and evaluation of production indicators of squab pigeons)</i>	<i>48</i>
<i>Alpár Botond - Tóth Tamás - Varga László: Fermentált folyékony takarmányok előállítási technológiai és etetésük előnyei a sertéshizlalásban - Mini szemleciikk (Fermented liquid feeds: manufacturing technologies and benefits of use in pig fattening - Mini-review)</i>	<i>68</i>
2022-ben sikeresen megvédett MTA doktori értekezés összefoglalója - Summary of DSc dissertation in the year of 2022	86
2022-ben sikeresen megvédett PhD disszertációk összefoglalói - Summaries of PhD dissertations in the year of 2022	89

Címlap kép (Frontpage photograph)

Húsgalambok (Fotó: Dr. Bagi Zoltán)

Squab pigeons (Photo: Zoltán Bagi Dr.)

FLOW-CASA: MOTILITÁSI PARAMÉTEREK GYORS, AUTOMATIZÁLT KLASZTERANALÍZISE FLOW CITOMETRIÁS ADATELEMZŐ SZOFTVER ALKALMAZÁSÁVAL

KOVÁCS BARNABÁS MIHÁLY- NAGY SZABOLCS TAMÁS

ÖSSZEFOGLALÁS

A gazdasági állatok spermaminőség-ellenőrzésének széles körben alkalmazott eszköze a számítógépes motilitásvizsgálat (Computer-Assisted Sperm Analysis, CASA), a műszerek több évtizede elérhető kereskedelmi forgalomban. A CASA rendszerek olyan speciális citométernek tekinthetők, amelyekkel nem fényintenzitási, hanem mozgási sebességértékeket rögzítenek, a kereskedelmi szoftverek azonban nem képesek a sejtszintű analízis végrehajtására, jellemzően csak az adott minta egyes spermium alpopulációinak arányát adják meg eredményként, ami jelentős információvesztést jelent. A szerzők előkísérletükben mélyhűtött-felolvasztott bikaspermiumok, illetve mellékheréből gyűjtött dámvad spermiumok motilitását értékelték egy kereskedelmi forgalomban elérhető CASA rendszerrel, fajspecifikus beállítások alkalmazása nélkül. A nyers adatfájlokat Excel szoftverrel rendezték táblázatba, majd txt formátumban mentve exportálták és elemezték egy flow (áramlási) citométeres adatelemző szoftverrel. A CASA által rögzített sebességértékek sejtszinten értékelhetőek, hasonlóan az áramlási citométerrel rögzített fényintenzitási értékekhez. A citométeres szoftver lehetővé teszi a sebességi paraméterek esetén is hisztogramok és kétdimenziós dot-plot ábrák vizualizációját, illetve az olyan adatelemzési eszközök alkalmazását is, mint a lin-log transzformáció, markerek és régiók kijelölése, kapuzás, különböző minták egymásra rétegezése, stb. A sejtszintű elemzés az egyes spermium alpopulációk biztosabb felismerését és a sejtlejtani változások érzékenyebb észlelését teszi lehetővé. Mivel fajspecifikus műszerbeállításokra nincs szükség, a CASA-elemzések eddig nem vizsgált állatfajokra is kiterjeszthetők. A többlépcsős adatkezelés és –értékelés felhasználási lehetőségei a spermatológiai alap kutatások, reprodukív toxikológiai vizsgálatok területén kereshetők.

SUMMARY

Kovács, B. M. – Nagy, Sz. T.: FLOW-CASA: FAST, AUTOMATED CLUSTER ANALYSIS OF MOTILITY PARAMETERS USING A FLOW CYTOMETRIC DATA ANALYSIS SOFTWARE

Computer-Assisted Sperm Analysis (CASA), is a widely used tool for controlling sperm quality in farm animals, and has been commercially available for several decades. CASA systems can be considered as special cytometers that record motion rate values rather than light intensity, but commercial CASA softwares are not capable of performing analysis at cellular level, typically reporting only the proportion of individual sperm subpopulations in a given sample, resulting in significant loss of information. In the preliminary experiment, motility of cryopreserved-thawed bull sperm and fallow deer sperm collected from the epididymis were evaluated using a commercial CASA system without the use of species-specific settings. Raw data files were tabulated with Excel software, then saved in txt format and analyzed with a flow cytometer data analysis software. The velocity values recorded by CASA can be evaluated at the cellular level, similar to the light intensity values recorded with a flow cytometer. The cytometer software also allows the visualization of histograms and two-dimensional dot-plot diagrams for velocity parameters, as well as the use of data analysis tools such as lin-log transformation, selection of markers and regions, gating, histogram overlay of different samples, etc. Cell-level analysis allows more reliable recognition of individual sperm subpopulations and more sensitive detection of sperm physiological changes. As species-specific instrument settings are not required, CASA measurements can be extended to previously untested species. This multi-stage data management and evaluation approach can be a useful tool in the basic spermatological research and reproductive toxicology studies.

BEVEZETÉS ÉS IRODALMI ÁTTEKINTÉS

A spermaminőség megítélésének legrégebbi, és a gyakorlatban máig is leginkább használt módszere a motilis spermiumok arányának mikroszkópos vizuális becslése. A módszer tagadhatatlanul gyors és egyszerű, azonban szubjektív: a vizsgálatok megbízhatóságát nagymértékben befolyásolja a mikroszkóp minősége, a vizsgáló gyakorlata és képességei (Althouse, 1997). Még tapasztalt technikusok is gyakran elfogadhatatlanul nagy eltéréssel értékelik ugyanazt a mintát (Jequier és Ukombe, 1983). Az egyes laboratóriumok és értékelő technikusok közötti variancia elfogadható szintűre csökkentése érdekében a mintavételt standardizálni célszerű (Althouse, 1997), és különös figyelmet kell szentelni a mikroszkóp tárgyasztalának, illetve a tárgylemezek, fedőlemezek egyenletes hőmérsékletére (Birks és mtsai, 1994). Külön figyelembe kell venni, hogy az üvegfelületek és a sperma között fennálló felületi feszültségváltozások is befolyásolják a vizuális értékelést (Molnár, 1962).

Az utóbbi évtizedek technikai és elsősorban számítógépes fejlődése lehetővé tette objektív motilitásvizsgálati módszerek kidolgozását (Amann, 1988; Holt, 1996). A számítógépes spermavizsgáló berendezések (CASA, computer-assisted semen analysis), nemcsak a mozgó spermiumok arányát, de a mozgás minőségét is értékelni képesek. A CASA berendezéseknek két fő típusa ismert, az egyik utólag értékeli a rögzített felvételeket, a másik azonnali, úgynevezett "real-time" értékelésre képes (Holt, 1996).

Bár a CASA rendszerek kifejlesztése során a fő cél az volt, hogy az egyes spermiumok egyedi mozgási karakterisztikáit lehessen értékelni (Amann és Waberski, 2014), a később kereskedelmi forgalomban megjelenő CASA rendszerek szoftverei jellemzően átlagértékeket közölnek az egyes spermium alpopulációk sebességi paramétereire vonatkozóan, ezzel jelentős adat- és információvesztést okozva (Holt, 1996). Tapasztalataink szerint bár az elmúlt évtizedekben a CASA eszközök hardveres fejlesztése nagy ívet futott be (ma már hordozható, akár mobiltelefonhoz kapcsolható eszközök is elérhetőek), a szoftveres oldalon továbbra sem megoldottak a közel 20 éve megfogalmazott kritikai észrevételek.

A spermium alpopulációk mozgási tulajdonságainak részletesebb vizsgálatára többen is alkalmaztak külső, statisztikai szoftveres analíziseket (Nagy és Péntek, 2005), ennek a megközelítésnek a lehetőségeit, kihívásait Martínez-Pastor és mtsai (2011) átfogó szemle cikkben ismertetik. A mélyebb statisztikai adatelemzés egyik fő akadálya azonban az, hogy nem minden CASA rendszer képes a nyers mérési adatok exportjára (Amann és Waberski, 2014).

A külső statisztikai szoftveres klaszteranalízis nyilvánvalóan mélyebb ismereteket, elemzési gyakorlatot igényel. A motilitásvizsgálat azonban egyfajta citometriai értékelésként is felfogható (Petrunkina és Harrision, 2013). Az áramlási citometria a spermavizsgálatok robusztus, gyors, precíz módszere (Nagy, 2002; Hossain és mtsai, 2011; Pena és mtsai, 2016), jellemzően olyan adatelemzési szoftveres megoldásokkal, mint a régióanalízis, kapuzás (a vizsgálat szempontjából jelentős, egyes tulajdonságokban egymáshoz hasonló események kijelölése és elkülönítése), többdimenziós megjelenítés, amelyek gyorsan és egyszerűen képesek az egyes sejt alpopulációk azonosítására, értékelésére. Ezek az opciók nem érhetőek el a CASA szoftverekben, holott alkalmazásuk az egyes motilitási, sebességi paraméterek esetében is indokolt lenne.

A jelen előkísérletünk célja az volt, hogy teszteljük egy CASA rendszerből exportált adatfájlok áramlási citometriás szoftverrel történő automatizált klaszteranalízisének lehetőségeit.

ANYAG ÉS MÓDSZER

A vizsgálatokhoz mélyhűtött-felolvasztott bika ($n=5$) és mellékheréből post mortem gyűjtött, mélyhűtött-felolvasztott dámvad ($n=1$) spermiumok CASA értékeléssel gyűjtött sebességi (curvilinear velocity - VCL, straight line velocity - VSL, average path velocity - VAP) adatait használtuk fel. A mérésekhez MTG MedeaLAB CASA-t alkalmaztunk a gyártó útmutatóit követve. A mérések során nem alkalmaztunk fajspecifikus műszerbeállításokat, csupán az ondósejtek és egyéb alakos elemek biztos megkülönböztetésére fordítottunk figyelmet. A nyers mérési adatokat Microsoft Excel adatkezelő szoftverbe exportáltuk, majd txt formátumban mentettük. A txt fájlokat Flowing ingyenes áramlási citométeres elemző szoftverrel értékeltük (www.flowingsoftware.com, v. 2.5.1.). Az adatelemzés során a citométeres szoftverben elérhető, a szórtfény- és fluoreszcenciaintenzitási paraméterek esetében alkalmazott olyan eszközöket alkalmaztunk, mint a log transzformáció, régiókijelölés, régió kapuzás, eltérő minták egymásra rétegzése. Az adatokat egydimenziós hisztogramokon és kétdimenziós dot-plot ábrákon jelenítettük meg (1.-4. ábrák).

EREDMÉNYEK ÉS KÖVETKEZTETÉSEK

Ahogy az 1. ábrán látható, a nyers CASA sebességi adatok (VCL, VSL, VAP) egydimenziós hisztogramon ábrázolva (1. a.-c. ábra) nem mutatnak normális eloszlást. Az adatok eloszlásának normalizálására ilyen esetben a log transzformáció alkalmazható (Petrie és Watson, 2013). Áramlási citométeres adatgyűjtés során lehetséges eleve log skálán történő adatrögzítés (Givan, 2001), de egyes flow citométeres adatelemző szoftverek, mint az általunk alkalmazott Flowing, utólagos lin-log transzformációt is lehetővé tesznek. Ahogy az 1. e.-g. ábrákon látható, az egyes sebességi paraméterek esetében a log transzformáció az adatok vizuálisan jobban értékelhető eloszlását eredményezte. Az 1. d. és h. ábrán kétdimenziós dot-plot ábrán illusztráljuk a VCL és VAP értékek eloszlását log transzformáció előtt (1. d.), illetve után (1. h. ábra).

Az 1. h. ábrán megjelenített VAP/VCL adatok egy vizuálisan elkülöníthető, nagy VAP és VCL sebességértékeket mutató alcsoportot alkotnak, amelyet R1 régióként jelöltünk meg a 2. a. ábrán. Az áramlási citométeres adatelemző szoftverek lehetővé teszik az egyes régiókban található sejtek más paraméterek ábrázolása során történő azonosítását az úgynevezett kapuzás alkalmazásával. A 2. b. ábrán ugyanazon spermaminta VSL értékeit mutatjuk be log transzformáció után, és a 2. c. ábrán az R1 régióban található sejtek VSL értékei láthatók kapuzás után. A 2. d. ábrán látható Flowing output a kétdimenziós VAP/VCL dot-plot X- és Y-tengelyén megjelenített adatok számtani, geometriai átlag, illetve medián értékeit adja meg, valamint megadja az R1 régióba eső spermiumok százalékos arányát.

1. ábra CASA sebességi paraméterek egydimenziós VCL, VSL, VAP hisztogramokon, illetve VCL/VAP kétdimenziós dot-ploton megjelenítve lineáris (1.a.–d.) és logaritmikus transzformációt követően (1.e.–h.)

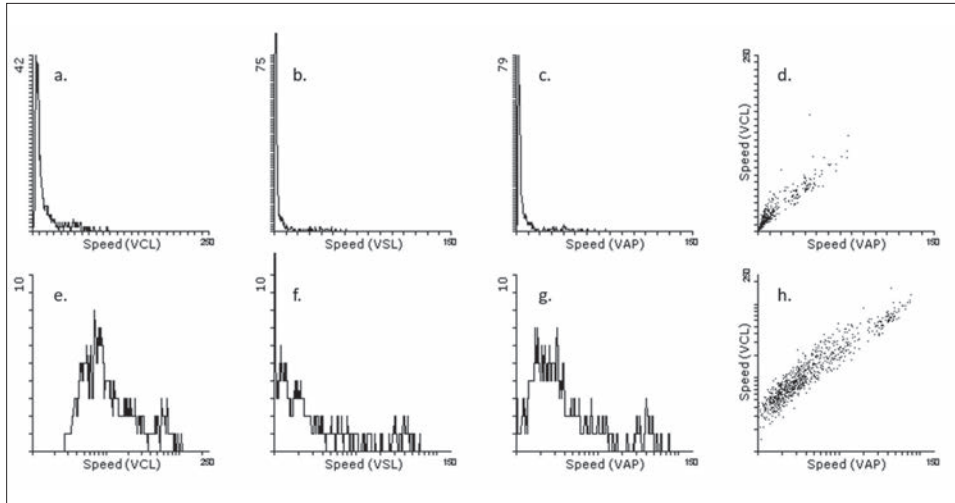


Figure 1. CASA velocity parameters displayed on one-dimensional VCL, VSL, VAP histograms and VCL / VAP two-dimensional dot-plots on linear scale (1.a.–d.) and after logarithmic transformation (1.e.–h.)

2. ábra VCL/VAP dot-ploton azonosított R1 régió (2. a.) VSL értékeinek megjelenítése kapuzás alkalmazásával. 2. b.: az összes adatot tartalmazó VSL hisztogram, 2. c.: az R1 régió kapuzott adatait tartalmazó VSL hisztogram. 2. d.: a dot-plot ábrán bemutatott VCL/VAP adatok számtani, geometriai átlag-, és medián értékei az x és y tengelyen, valamint az R1 régióba eső események százalékos értéke (Flowing output).

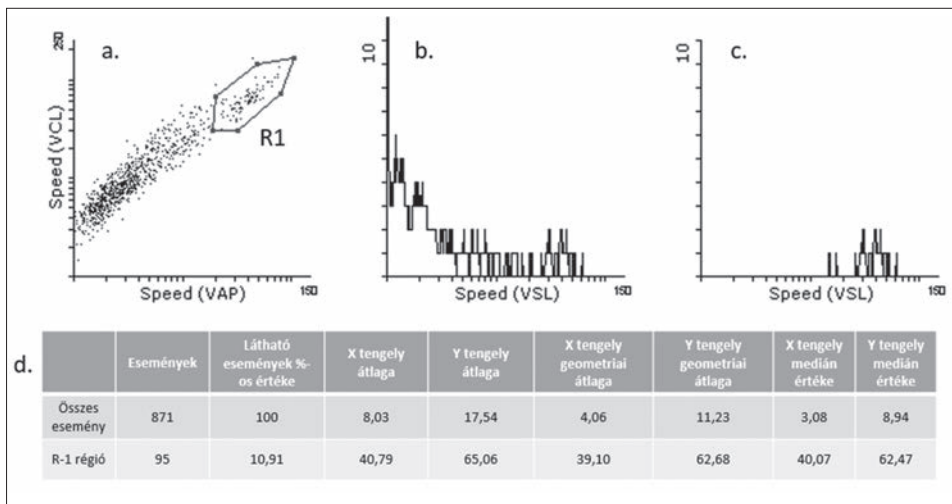


Figure 2. VSL values of events in the R1 region identified on a VCL / VAP dot plot (2. a.) using gating. 2. b. : VSL histogram containing all data, 2. c. : VSL histogram containing gated data from the R1 region. 2. d. : Arithmetic, geometric mean, and median values on the x and y axes of the VCL / VAP data presented in the dot-plot figure, as well as the percentage of events in the R1 region (Flowing output).

3. ábra Öt bika log-transzformált, egyedi eltéréseket mutató VAP-hisztogramprofilja (3. a.–e.), illetve az 1., 3. és 5. bika egymásra rétegzett histogramja (3. f.)

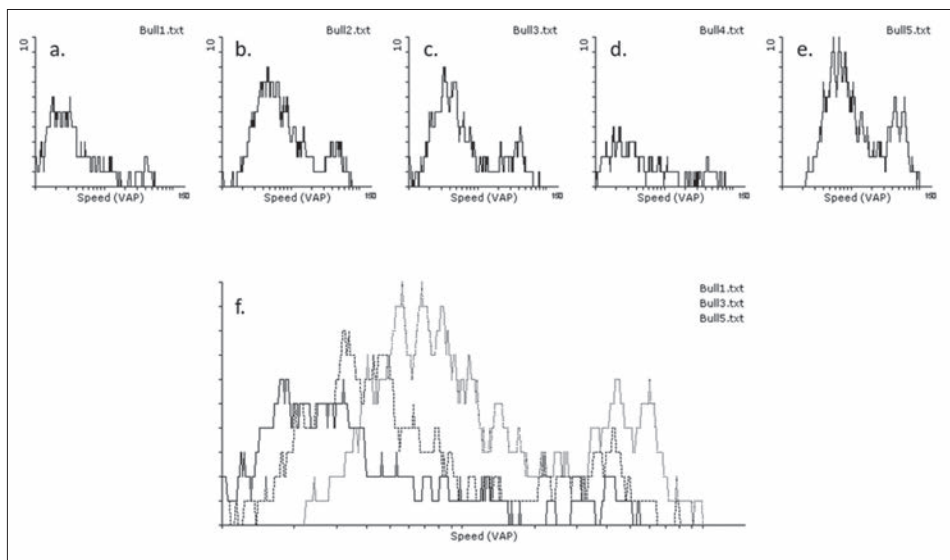


Figure 3. Log-transformed VAP histogram profile of five bulls showing individual differences (3.a.–e.). Histogram overlay of bulls 1, 3, and 5 (3. f.)

A 3. ábrán öt tenyészbika egyedi, log-transzformált VAP hisztogramprofiljai láthatók (3. a.–e.). A citométeres adatelemző szoftver lehetővé teszi egyedi hisztogramok egymásra rétegzését a gyors, vizuális értékeléshez. A 3. f. ábrán az első, harmadik és ötödik tenyészbika hisztogramjait vetítettük egymásra.

A 4. ábrán két faj egy-egy egyedének VAP hisztogramprofiljait mutatjuk be (4. a.: dámvad, 4. b.: tenyészbika), a 4. c. ábrán az egymásra vetített hisztogramok láthatók.

A sejtszintű elemzés az egyes spermium alpopulációk biztosabb felismerését és a sejtéletani változások érzékenyebb észlelését teszi lehetővé. Mivel fajspecifikus műszerbeállításokra nincs szükség, a CASA-elemzések eddig nem vizsgált állatfajokra is kiterjeszthetők. A hisztogramanalízis az egyes egyedek, illetve különböző fajok eltéréseinek gyors vizualizálását teszi lehetővé. A többlépcsős adatkezelés és –értékelés azonban nem valószínű, hogy a rutin spermaértékelés eszköze lesz, felhasználási lehetőségei inkább a spermatológiai alap kutatások, reprodukív toxikológiai vizsgálatok területén kereshetők.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

A publikáció elkészítését a EFOP-3.6.3-VEKOP-16-2017-00008 számú projekt támogatta. A projekt az Európai Unió támogatásával, az Európai Szociális Alap társfinanszírozásával valósult meg.

4. ábra Mellékheréből kimosott dámvad spermiumok (4. a.) és ejakulált bikaspermiumok (4. b.) mélyhűtés-felolvasztást követően mért, log-transzformált VAP-hisztogramjai külön és egymásra rétegezve (4. c.)

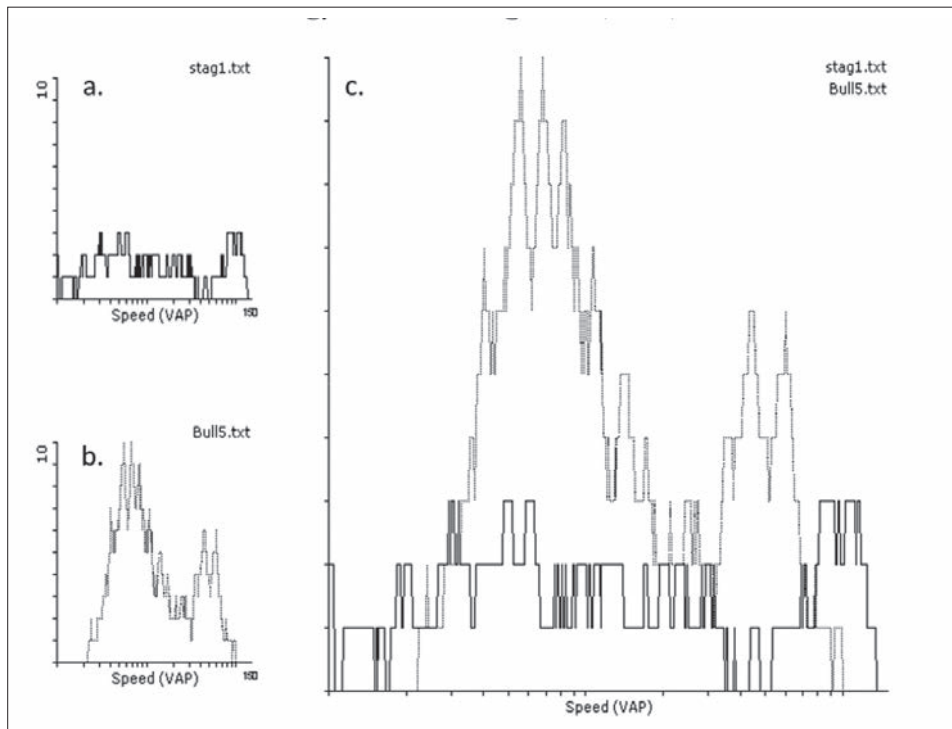


Figure 4. Log-transformed VAP histograms of fallow deer sperm washed from the epididymis (4. a.) and ejaculated bull sperm (4. b.) separately and using histogram overlay (4. c.)

IRODALOMJEGYZÉK

- Althouse, G. C. (1997): Evaluating porcine semen for artificial insemination. Part I. Standard tests. Food Anim. Pract., 30-35.
- Amann, R. P. – Waberski, D. (2014): Computer-assisted sperm analysis (CASA): capabilities and potential developments. Theriogenology, 81. 5-17.
- Amann, R. P. (1988): Relationships between computerized evaluations of spermatozoal motion and competitive fertility index. Proc 12th Tech Conf AI and Reproduction, 38-44.
- Birks, A. G. – Izzard, H. – Morroll, D. R. – Prior, J. R. – Troup, S. A. – Liebermann, B. A. – Matson, P. L. (1994): The routine assessment of sperm motility at room temperature and 37°C. Int. J. Androl. 17. 289-291.
- Givan, A. L. (2001): Flow Cytometry, First principles. Wiley-Liss, Inc., 296.
- Holt, W. V. (1996): Can we predict fertility rates? Making sense of sperm motility. Reprod. Dom. Anim., 31. 17-24.
- Hossain, M. S. – Johannisson, A. – Wallgren, M. – Nagy, S. – Siqueira, A. P. - Rodriguez-Martinez, H. (2011): Flow cytometry for the assessment of animal sperm integrity and functionality: state of the art. Asian J. Androl., 13. 406-419.
- Jequier, A. M. – Ukombe, E. B. (1983): Errors inherent in the performance of a routine semen analysis. Brit. J. Urol., 55. 434-436

- Martínez-Pastor, F. - Tizado, E. J. – Garde, J. J. - Anel, L. - de Paz, P. (2011):* Statistical Series: Opportunities and challenges of sperm motility subpopulation analysis. *Theriogenology*, 75. 783-795.
- Molnár, J. (1962):* Általános spermatológia. Akadémiai kiadó, Budapest. 252.
- Nagy, Sz. - Péntek, I. (2005):* Motilitásról másképp. *Állattenyésztés és Takarmányozás*, 54. 198-203.
- Nagy, Sz. (2002):* Emlős-spermiumok membránintegritás-vizsgálatai: Irodalmi áttekintés *Állattenyésztés és Takarmányozás*, 51. 607-616.
- Peña, F. J. - Ortega Ferrusola, C. - Martín Muñoz, P. (2016):* New flow cytometry approaches in equine andrology. *Theriogenology*, 86. 366-372.
- Petrie, A. - Watson, P. F. (2013):* Statistics for Veterinary and Animal Science, 3rd ed., Blackwell Publishing, Oxford, 408.
- Petrunkina, A. M. – Harrison, R. A. (2013):* Fluorescence technologies for evaluating male gamete (dys)function. *Reprod. Domest. Anim.*, 48. 11-24.

Érkezett: 2022. április

Szerzők címe: Kovács B. M. - Nagy SZ. T.

Authors' address: Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem, Állattenyésztési Tudományok Intézet
H-8360 Keszthely, Deák Ferenc u. 16.
Nagy.Szabolcs.Tamas@uni-mate.hu