

**Nyugat – Magyarországi Egyetem,
Mezőgazdaság- és Élelmiszertudományi Kar**

Állattudományi Intézet

**Az állati termék előállítás biológiai, technológiai,
ökológiai, takarmányozási és ökonómiai kérdései Doktori
Iskola**

**Doktori iskola vezetője
Dr. Benedek Pál**

**Az állati termék termelés nemesítési és
tartástechnológiai vonatkozásai program**

**Programvezető
Kovácsné Dr. Gaál Katalin**

**Témavezető
Dr. Bali Papp Ágnes**

**IN VITRO SERTÉSEMBRIÓ – ELŐÁLLÍTÓ
RENDSZER VIZSGÁLATA**

VARGA ERIKA

Mosonmagyaróvár

2007

IN VITRO SERTÉSEMBRIÓ – ELŐÁLLÍTÓ RENDSZER VIZSGÁLATA

című értekezést

a doktori (PhD) fokozat elnyerése érdekében írta

Varga Erika.

Készült a Nyugat – Magyarországi Egyetem
Mezőgazdaság- és Élelmiszertudományi Karán,

Az állati termék előállítás biológiai, technológiai, ökológiai, takarmányozási
és ökonómiai kérdései Doktori Iskola,

Az állati termék termelés nemesítési és tartástechnológiai vonatkozásai
program keretében.

Témavezető: Dr. Bali Papp Ágnes

Elfogadásra javaslom (igen / nem)

.....

Témavezető

A jelölt a doktori szigorlaton..... % -ot ért el.

.....

Szigorlati Bizottság Elnöke

Mosonmagyaróvár, 2007.

Az értekezést bírálóként elfogadásra javaslom (igen /nem)

Első bíráló (Dr. Solti László) igen /nem

.....
aláírás

Második bíráló (Dr. Rátky József) igen /nem

.....
aláírás

(Esetleg harmadik bíráló (Dr.....) igen /nem

.....
aláírás

A jelölt az értekezés nyilvános vitáján.....% - ot ért el.

Mosonmagyaróvár, 2007.

.....
Bírálbizottság Elnöke

A doktori (PhD) oklevél minősítése.....

.....
Az EDT Elnöke

TARTALOMJEGYZÉK

TARTALOMJEGYZÉK	4
KIVONAT	6
ABSTRACT	8
RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	9
1. BEVEZETÉS	11
1.1. Az értekezés célkitűzései	13
2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS	14
2.1. In vitro sertésembrió-előállító rendszer	14
2.1.1. <i>In vitro</i> sertésembrió-előállítás: múlt és jelen	14
2.1.2. Petesejtek kinyerése	15
2.1.3. Petesejtek érése, <i>in vitro</i> maturációja (IVM)	17
2.1.4. Spermiumok előkészítése a termékenyítéshez (<i>in vitro</i> kapacitáció)	22
2.1.5. <i>In vitro</i> termékenyítés (IVF)	25
2.1.6. <i>In vitro</i> kultivációs rendszer (IVC)	29
2.2. Partenogenetikus aktiválás	31
2.2.1. Petesejtek aktiválásának alapjai	32
2.2.2. Petesejtek mesterséges aktiválásának módjai	34
2.3. Génmegőrzés – Gaméták vitrifikációs hűtése	38
2.3.1. A mangalica sertés	38
2.3.2. Gaméták, embriók krioprezervációja	39
2.3.3. A vitrifikáció során alkalmazott oldatok	43
2.3.4. Visszaolvasztás	46
2.3.5. Sejtkárosodások a hűtés/visszaolvasztás során	46
3. ANYAG ÉS MÓDSZER	49
3.1. Sertés petesejtek aktiválása	49
3.1.1. Alkalmazott vegyszerek	49
3.1.2. Petesejtek gyűjtése	50
3.1.3. Petesejtek <i>in vitro</i> érlelése	50
3.1.4. Az <i>in vitro</i> maturáció sikerének értékelése	51
3.1.5. Petesejtek aktiválása	51
3.1.6. Az aktiválódás meghatározása	51
3.1.7. Az embriók <i>in vitro</i> tenyésztése	52
3.1.8. Az embriófejlődés eredményességének meghatározása	52
3.1.9. Kísérleti terv	52
3.1.10. Statisztikai vizsgálat	53
3.2. Sertés petesejtek krioprezervációja	54
3.2.1. Alkalmazott vegyszerek	54
3.2.2. Petesejtek gyűjtése	55
3.2.3. Petesejtek <i>in vitro</i> érlelése	55
3.2.4. Az <i>in vitro</i> érlelés sikerének értékelése	55
3.2.5. Petesejtek vitrifikálása OPS módszerrel	55
3.2.6. Petesejtek visszaolvasztása	55
3.2.7. Petesejtek vizsgálata	56
3.2.8. <i>In vitro</i> termékenyítés	56

3.2.9. Termékenyített petesejtek kultiválása	56
3.2.10. Termékenyülési ráta meghatározása	57
3.2.11. Kísérleti terv	57
3.2.12. Statisztikai vizsgálat	58
3.3. Mangalica petesejtek in vitro maturáltatása és krioprezervációja	58
3.3.1. Alkalmazott vegyszerek.....	58
3.3.2. Petesejtek gyűjtése	59
3.3.3. Petesejtek in vitro érlelése.....	59
3.3.4. Az in vitro érlelés sikerének értékelése.....	59
3.3.5. Petesejtek vitrifikálása	59
3.3.6. Petesejtek visszaolvasztása	60
3.3.7. Petesejtek vizsgálata a visszaolvasztást követően.....	60
3.3.8. In vitro termékenyítés.....	60
3.3.9. Az embriók in vitro tenyésztése.....	60
3.3.10. Az embriófejlődés eredményességének meghatározása	60
3.3.11. Kísérleti terv	61
3.3.12. Statisztikai vizsgálat	61
4. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK	62
4.1. Sertés petesejtek aktiválása	62
4.1.1. Eredmények	62
4.1.2. Eredmények értékelése, következtetések	67
4.2. Sertés petesejtek krioprezervációja	70
4.2.1. Eredmények	70
4.2.2. Eredmények értékelése, következtetések	73
4.3. Mangalica petesejtek maturáltatása és krioprezervációja	76
4.3.1. Eredmények	76
4.3.2. Eredmények értékelése, következtetések	79
5. ÚJ, TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK.....	81
5.1. Sertés petesejtek aktiválása	81
5.2. Sertés petesejtek krioprezervációja	81
5.3. Mangalica petesejtek maturáltatása és krioprezervációja	81
6. JAVASLATOK.....	82
6.1. Sertés petesejtek aktiválása	82
6.2. Sertés petesejtek krioprezervációja	82
6.3. Mangalica petesejtek maturáltatása és krioprezervációja	83
7. ÖSSZEFOGLALÁS.....	84
8. MELLÉKLETEK	87
9. IRODALOMJEGYZÉK.....	97
KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	121

KIVONAT

Az alkalmazott biotechnológiai eljárások többségének az alapját a laboratóriumi körülmények között előállított embriók adják, ami jól működő *in vitro* embrió-előállító rendszer meglétét feltételezi.

Az értekezés első részében *in vitro* maturáltatott sertés petesejteket stroncium-kloriddal [SrCl_2], cikloheximiddel [CX], 6-dimetil-aminopurinnal [6-DMAP] és SrCl_2 +CX [SCX], illetve SrCl_2 +6-DMAP [SD] kombinációjával kezeltünk, majd értékeltük az alkalmazott kemikáliák petesejtek aktiválódására és az embriók fejlődésére gyakorolt hatását. Három kísérletsorozatban összesen 2401 petesejtet vizsgáltunk meg.

Eredményeink szerint az egyes kezelések hatására a petesejtek a kontroll csoporthoz képest, szignifikánsan nagyobb arányban kezdték meg az embriófejlődést. A vizsgált vegyszerek közül a SrCl_2 +CX kombinációjának hatására aktiválódtak a legnagyobb arányban a petesejtek. Szintén a SrCl_2 +CX-del kezelt petesejtek esetében figyeltük meg a legnagyobb blasztociszta–arányt (25,93 %).

A disszertáció második részében sertés petesejtek krioprezervációjával kapcsolatban végeztünk vizsgálatokat. A 10 évvel ezelőtt bemutatott „nyitott végű műszalma” (OPS) vitrifikációs eljárást alkalmaztuk sertés petesejtek fagyasztására/visszaolvasztására. Két kísérletsorozatban, összesen 2237 petesejtet vizsgáltunk meg.

A kumuluszsejtek, *in vitro* maturáltatott petesejtek fagyasztást/visszaolvasztást követő élet- és fejlődőképességére, illetve termékenyülésére gyakorolt szerepét vizsgálva megállapítottuk, hogy a kumuluszsejtekkel körülvett, *in vitro* maturáltatott (M-II) petesejtek jobban tolerálták a hűtés során fellépő károsodásokat; a visszaolvasztott/termékenyített petesejtek fertilizációs rátája nagyobb volt, mint a szintén *in vitro* maturáltatott (M-II), ugyanakkor a maturáció után pipettázással „lecsupasztott”, kumuluszsejtek nélkül fagyasztott petesejteké.

A kinyerés után közvetlenül fagyasztott, illetve a kinyerést követően *in vitro* maturáltatott petesejtek vitrifikációs eljárással szembeni érzékenységét vizsgálva, a kapott eredmények azt mutatják, hogy a petesejtek fagyasztást/visszaolvasztást követő *in vitro* maturációja rosszabb hatásfokú, mint a vitrifikációt megelőző érlelés. Az alkalmazott vitrifikációs eljárás az éretlen, kumuluszsejtek nélkül fagyasztott petesejtek esetében volt a legrosszabb hatásfokú, míg a kumuluszsejtekkel körülvett, *in vitro* maturáltatott petesejtek esetében volt a leghatékonyabb.

A tanulmány harmadik részében bemutatott vizsgálatok mangalica petesejtek *in vitro* maturációjára, vitrifikációjára és a visszaolvasztást követő *in vitro* fertilizációjára irányultak.

Eredményeink mutatják, hogy a vágóhídi petefészkekből származó, mangalica petesejtek (n=658), a nagy fehér sertés (n= 676) petesejtekhez

hasnólóan, 42 óra alatt sikeresen maturáltathatók *in vitro* körülmények között.

Megvizsgáltuk továbbá azt is, hogy a mangalica petesejtek a nagy fehér oocitákhoz képest hogyan reagálnak a hűtés során fellépő változásokra. Azt tapasztaltuk, hogy a mangalica petesejtek a nagy fehér petesejtekkel szemben kevésbé tolerálták a hűtési eljárás során bekövetkezett változásokat, ami a nagyobb petesejt–degenerálódásban nyilvánult meg.

Az egyes csoportokban értékeltük a visszaolvasztást/termékenyítést követő embriófejlődést is. Az OPS eljárással fagyasztott/visszaolvasztott, továbbá termékenyített mangalica petesejtek több mint 50 %-a megkezdte az embrionális fejlődést.

Az eredmények jelzik, hogy a különböző fajták esetében szükség lehet a vitrifikációs eljárás finomítására, az ekvibrációs idők, és az alkalmazott krioprotektív anyagok koncentrációjának módosítására.

ABSTRACT

In the present study, parthenogenetic development of porcine oocytes treated with chemical agents, *in vitro* fertilization and subsequent embryonic development of vitrified/warmed porcine (Large White and Mangalica) oocytes were investigated.

The objectives of the first part of the study were first to assess the ability of strontium-chloride (SrCl_2) to induce parthenogenetic development in porcine oocytes in comparison with cycloheximide (CX) and 6-dimethylaminopurine (6-DMAP); and second to verify whether the combination of the treatments improved activation and parthenogenetic development rates. The results show that porcine *in vitro* matured oocytes could be artificially activated by cycloheximide, 6-dimethylaminopurine and strontium-chloride. We find that the combination of cycloheximide and strontium-chloride were the most effective on oocyte activation, subsequent parthenogenetic development and blastocyst rate.

The role of cumulus cells during vitrification was examined in the second part of the study. The effect of cumulus cells on the viability and fertilization rate of the vitrified/warmed oocytes was investigated. The results show that the Open Pulled Straw (OPS) vitrification is the most effective in cumulus enclosed, metaphase II stage oocytes. The aim of our second experiment was to compare immature and *in vitro* matured porcine oocytes regarding their viability and the ability to be fertilized after vitrification by the OPS method. It seems that M-II stage oocytes surrounded with cumulus cells had better resistance to cryoinjuries than GV-stage oocytes also surrounded with cumulus cells. Our result is in accordance with the finding of Rojas (2004), who described that GV-stage oocytes were more sensitive to chilling injuries than M-II oocytes.

The aims of the third part of the study were to mature Mangalica oocytes from slaughterhouse ovaries and to cryopreserve Mangalica oocytes with the OPS method. In the first experiment, maturation rate of Mangalica (Hungarian native pig breed) and Large White porcine oocytes were compared. No significant difference was observed in the nuclear maturation rate of Mangalica and Large White porcine oocytes. In the second experiment, the sensitivity of oocytes to OPS vitrification was examined by evaluating oocyte morphology after thawing. A higher percentage of Large White porcine oocytes showed normal morphology compared to Mangalica oocytes, indicating that Mangalica oocytes are more sensitive to cryoinjuries than Large White oocytes. However, the OPS vitrification method is suitable for the preservation of Mangalica oocytes can successfully initiate embryonic development after *in vitro* fertilization. Because of the differences between Mangalica and Large White oocytes, it appears that the information obtained from experiments using Large White oocytes is not entirely useful for Mangalica oocytes. Further studies are therefore needed to establish optimal concentrations for cryopreservation of Mangalica oocytes.

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

BSA	Szarvasmarha szérumalbumin
cAMP	Ciklikus adenzin monofoszfát
CB	Citohalazin-B
CG	Kortikális granulum
COC	Kumuluszsejtekkel körülvett petesejt
CPA	Krioprotektív anyag
CX	Cikloheximid
dbcAMP	Dibutiril-ciklikus adenzin-monofoszfát
6-DMAP	6-dimetil-aminopurin
DMSO	Dimetil-szulfoxid
EDTA	Etilén-diamin-tetra-acetát
EG	Etilén-glikol
EGF	Hámnövekedési faktor
ER	Endoplazmatikus retikulum
FCS	Újszülött borjú szérum
FSH	Follikulus-stimuláló hormon
GSH	Glutation (r-glutamil-ciszteinil-glicin)
GV	Germinális Vezikulum (Csírahólyag)
GV-I	Germinális Vezikulum-I stádium
GV-II	Germinális Vezikulum-II stádium
GV-III	Germinális Vezikulum-III stádium
GV-IV	Germinális Vezikulum-IV stádium
GVBD	Germinális Vezikulum lebomlása
hCG	Human chorion gonadotropin hormon
HEPES	N (2-hidroxietil)-piperazin-N'-(2-etánszulfát)
ICSI	Citoplazmába történő sperma injektálás
IGF-1, IGF-2	Inzulin-szerű növekedési faktor 1, 2
IVP	<i>In vitro</i> embrióelőállítás
IVM	<i>In vitro</i> maturáció
IVF	<i>In vitro</i> fertilizáció

IVC	<i>In vitro</i> embriótenyésztés
LH	Luteinizáló hormon
LN₂	Folyékony nitrogén
M-I	Metafázis-I stádium
M-II	Metafázis-II stádium
MAPK	Mitogén-aktivált protein kináz
MVC	Minimális térfogatban való hűtési eljárás
NGF	Idegi növekedési faktor
OF	Petevezető folyadék
OPS	„Nyitott végű műszalma” vitrifikációs eljárás
OPU	Ultrahangos petesejtkinyerés
PFF	Sertés follikulum-folyadék
PGM	Sertés gaméták számára kifejlesztett oldat
PMSG	Vemhes kanca szérum gonadotropin
ROS	Reaktív oxigén gyök
SSV	Előhűtött felületen történő vitrifikációs eljárás
TCM-199	Szövettenyésztő oldat
TGF	Szöveti növekedési faktor
TALP	Tyrodé's albumin-laktát-piruvát oldat
TLP	Tyrodé's laktát-piruvát oldat
ZBA	„Peteburok kötődési” teszt
ZP	Zona Pellucida

1. BEVEZETÉS

„Ex ovo omnia”

A biotechnológia fogalmának első meghatározása a magyar Ereky Károly nevéhez fűződik. A biotechnológia kifejezést 1918-ban, egyik előadásában használta először, valamint az első közlemény is az ő nevéhez fűződik (Ereky, 1919). Ennek megfelelően világszerte Ereky Károlyt tekintik a biotechnológia atyjának. Megfogalmazása szerint a biotechnológia a biokémia, a mikrobiológia és a mérnöki tudományok integrált alkalmazása mikroorganizmusok, állati/növényi sejtek és szövetek vagy ezek részeinek technológiai felhasználása céljából.

Az Európai Biotechnológiai Szövetség a biotechnológiát a következőképpen definiálja: a biotechnológia a természettudományok és a műszaki tudományok integrálását jelenti annak érdekében, hogy organizmusokat, sejteket, vagy azok részeit illetve molekula analógjait alkalmazzák a termelésben vagy a szolgáltatásban.

A XXI. századot a biotechnológia forradalmának tartják. A biotechnológiai (molekuláris biológiai, genetikai) tudományok fontossága abban rejlik, hogy az emberiség globális problémáinak megoldásához újszerű módon tudnak hozzájárulni. A biotechnológia tudományos eredményeit széles körben alkalmazza a gyógyszeripar (antibiotikumok, vitaminok, hormonok), a fermentációs ipar (alkohol, szerves savak, biopolimerek), a mezőgazdaság (növénynevelés, állattenyésztés), az élelmiszer- és takarmányipar (édesítők, enzimek, aminosavak, ízfokozók), a környezetvédelem (biológiai szennyvíz- és levegőtisztítás), a vegyipar (biotranszformációk) és az orvostudomány (enzimek, gyógyszerek).

A gazdasági állatok szaporodásával kapcsolatos biotechnikai/ biotechnológiai módszerek magukban foglalják az asszisztált reprodukciós technikákat (mesterséges termékenyítés, ivarzásszinkronizálás, embriótranszfer, gaméták és embriók krioprezervációja, *in vitro* embrió-előállítás, embriószexálás, magátültetés, DNS mikroinjektálás, klónozásos technikák), és a molekuláris genetikai eljárásokat (genomanalízis, molekuláris diagnosztika, génmódosítások).

Az elmúlt években több átfogó cikk tárgyalta az *in vitro* előállított sertésembriók lehetséges gyakorlati felhasználását (Faber et al., 2003; Lee et al., 2005).

Az IVM–IVF számos előnyt kínál az állattenyésztés számára: lehetőség van viszonylag olcsón, rövid idő alatt nagyszámú embrió előállítására, melyek egyéb biotechnológiai kísérletek alapanyagául szolgálhatnak (Braga et al., 2007).

Az embrió-előállításnak komoly szerepe lehet a kihalóban lévő fajok és fajták megmentésében, a biodiverzitás fenntartásában és növelésében, a génmegőrző munkában.

In vitro előállított embriókat használnak sejtmag-átültetési klónozáshoz, illetve génmódosítással kapcsolatos kísérletekben, transzgénikus sertések előállításához. Az első klónozott sertések megszületését a PPL Therapeutics 2000-ben jelentette be, majd körülbelül egy évvel később létrehozta az első genetikailag módosított sertés klónokat is.

Az utóbbi évtizedekben megnőtt az érdeklődés a sejtmag-átültetési klónozás iránt; ez a technológia ugyanis a nagy értékű tenyészállatok tömeges előállításának elméletileg leghatékonyabb klónozási formája (Solti, 1997, Campbell et al., 2007). Ez az eljárás azonban megfelelő *in vitro* maturációs- és kultivációs rendszert, továbbá mikromanipulációs és sejtfúziós berendezést igényel.

Az első transzgénikus sertésekről 1985-ben két kutatócsoport is beszámolt (Brem et al., 1985; Hammer et al., 1985). A genetikailag módosított sertéseket felhasználhatja a gyógyszeripar, a mezőgazdaság és a humán gyógyászat is. Lehetőség van ritka és drága fehérjék termeltetésére (pl. inzulin, interferon, véralvadási faktorok) génmódosított állatokkal, illetve a génmódosított sertések humán betegségek modelljei lehetnek, így mód nyílik a különböző emberi betegségek tanulmányozására és hatékony kezelés kidolgozására (Illmensee, 2002). A sertés, mint modellállat alkalmas lehet például az arteriosclerosis tanulmányozására (Shimokawa et al., 1983).

A kutatókat régóta foglalkoztatja az állati eredetű sejtek, szövetek emberbe történő átültetése. Az egyre súlyosabbá váló donorhiány miatt a xenotranszplantáció, mint lehetséges megoldás került a figyelem középpontjába (Platt, 1997). Az emberhez filogenetikailag legközelebb álló emberszabású majmok szervdonorként nem használhatók fel. A legjelentősebb ellenérvek, hogy nagyrészt veszélyeztetett fajokról van szó, nehezen szaporíthatók, a tudomány jelen állása szerint nincsenek megfelelő technikák a genetikai módosításukhoz, illetve szerveik mérete az emberétől jelentősen eltér, továbbá filogenetikai közelségük miatt megbetegedéseket okozhatnak az emberben. Jelenleg a tudomány a sertést tartja a xenotranszplantáció legalkalmasabb donorának (Daar, 1999), mert nagy számban hozzáférhető, a genetikai módosítás lehetősége biztosított, illetve etikai problémák kevésbé merülnek fel. Mivel a felnőtt sertések szervei az emberénél nagyobbak, egyre több kutatócsoport fordult az ún. törpesertés tenyésztése felé (Bach, 1997; Cascalho et al., 2006). A minisertés szervei méretüket tekintve az emberi szerveknek megfelelőek, továbbá immunbiológiai szempontból is alkalmasak lehetnek a transzplantációra (Swindle et al., 1998).

A sertések genetikai módosítása a színhúskihozatal és a húsminőség javításának irányába, a mezőgazdaság számára is előnyöket jelenthet (Yang et al., 2000).

„Magyarországon rendelkezésre áll az a szellemi bázis, amely a biotechnológia alkalmazásában nemzetközi színvonalú tevékenységet folytat” –mondta Németh Imre, volt földművelésügyi és vidékfejlesztési miniszter 2003-ban, a Magyar Tudomány Napja alkalmából rendezett tanácskozáson.

Hazánkban a biotechnológia jelentőségét már a XX. század elején felismerték a kutatók. Jelenleg több hazai kutatócsoport foglalkozik reprodukív-biotechnológiai kutatásokkal. A Szent István Egyetem, Állatorvos-tudományi Karán Pribenszky Csaba és Solti László egérembriók vitrifikációs hűtését (Pribenszky et al., 2004), a Debreceni Agrártudományi Egyetemen Nánássy László sertés petesejtek aktiválását (Nánássy et al., 2007a), az Állattenyésztési és Takarmányozási Kutatóintézetben Rátky József és Egerszegi István mangalica süldők és kocák reprodukciós tulajdonságait vizsgálják (Rátky et al., 2005; Egerszegi et al., 2003). A Mezőgazdasági Biotechnológiai Kutatóközpontban sejtmag-átültetéses klónozással és egérembriók aktiválásával kapcsolatban Dinnyés András vezet kutatásokat (Dinnyés et al., 2005), míg Somfai Tamás sertés embriók vitrifikációs hűtésével foglalkozik (Somfai et al., 2006). A Nyugat–Magyarországi Egyetem Mezőgazdaság- és Élelmiszertudományi Karán Bali Papp Ágnes kutatócsoportja sertés petesejtek vitrifikációs hűtésével és mangalica sertések genomvizsgálatával kapcsolatos kutatásokat végez (Bali Papp et al., 2005).

1.1. Az értekezés célkitűzései

Az értekezésben bemutatott vizsgálatok céljai a következők voltak:

1. Sertésembriók előállítása *in vitro* maturáltatott, kémiai úton aktivált petesejtekből.
2. Sertés petesejtek vitrifikációs hűtése
 - A kumuluszsejtek *in vitro* maturáltatott sertés petesejtek fagyasztást/visszaolvasztást követő élet- és fejlődőképességére, termékenyülésére kifejtett hatásának vizsgálata.
 - *In vitro* maturáltatott, illetve a kinyerés után közvetlen fagyasztott oociták „nyitott végű műszalma” vitrifikációs eljárással szembeni érzékenységének értékelése.
3. Mangalica petesejtek *in vitro* maturáltatása, vitrifikációja, továbbá visszaolvasztást követő *in vitro* termékenyítése és az embriófejlődés vizsgálata.

2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

2.1. In vitro sertésembrió-előállító rendszer

2.1.1. In vitro sertésembrió-előállítás: múlt és jelen

Az *in vitro* embrió-előállítás (IVP) 4 fő technológiai lépést foglal magában: a petesejtek *in vitro* maturáltatását (IVM), a spermiumok *in vitro* kapacitációját, az *in vitro* termékenyítést (IVF) és a fejlődő embriók tenyésztését (IVC).

1965-ben Edwards, 1968-ban Donahue, 1972-ben Calarco és munkatársai sikeresen maturáltattak egér, juh, szarvasmarha, majom és emberi (!) petesejteket laboratóriumi körülmények között. Sertés esetében az első sikeres IVM-ről Motlik és Fulka számolt be 1976-ban; *in vitro* maturált petesejteket a beültetést követően sikeresen termékenyítettek *in vivo*.

A kapacitáció fontosságát Austin és Chang 1951-ben, egymástól független kutatásaikban fedezték fel – ez a felismerés a későbbiekben lehetővé tette *in vitro* körülmények között termékenyítésre alkalmas spermiumok előállítását. Később több tanulmány is született az *in vitro* kapacitációt biztosító eljárásokkal kapcsolatban (Cross, 1998; Matas et al., 2003).

Az első *in vitro* fertilizációról Pincus és Enzmann (1934) számolt be, azonban munkájukról később kiderült, hogy a termékenyülés a petesejtek visszaültetését követően, *in vivo* történt meg. Pincus 1934-es közleményében jelent meg először az „*in vitro*” kifejezés.

Az első sikeres IVF végrehajtása Chang (1959) nevéhez fűződik, aki nyúl petesejtekkel kísérletezett.

Edwards és kutatócsoportja (1969) humán IVP-rendszer fejlesztésén dolgozott: a kapacitációs rendszert az oldathoz adott pufferekkel próbálták tökéletesíteni. Sikerült emberi petesejteket termékenyíteniük, beültetniük, végül 1978-ban megszületett Louise Brown, az első „lombikbébi”. Ezzel új korszak vette kezdetét az embriológiában.

1978-ban Iritani kutatócsoportja számolt be az első sikeres *in vitro* maturált és *in vitro* termékenyített sertés petesejtekről. Az IVF-hoz a koca nemi traktusában inkubált spermiumokat használtak; megállapították, hogy a mellékheréből nyert spermiumok nagyobb arányban kapacitálódnak, mint az ejakulált spermiumok.

Nagai a mellékheréből származó, fagyasztott/visszaolvasztott kanspermával sikeres *in vitro* fertilizációt végzett 1988-ban.

Mattioli 1989-ben számolt be sikeres embriótenyésztésről: sertés IVM–IVF petesejteket blasztociszta stádiumig kultivált.

In vitro előállított, különböző fejlettségű sertésembriók beültetésével sikerült malacokat produkálni: Yoshida (1993a) 2–4 sejtes embriókat, Day (1998)

morulákat, Kikuchi (2002) blasztocisztákat ültetett át recipiens kocákba, melyekből malacok is születtek.

Napjainkban számos kutatócsoport végez vizsgálatokat az IVP-rendszer fejlesztése céljából (Abeydeera et al., 2001; Gil et al., 2003; Men et al., 2005; Suzuki et al., 2006), ugyanis az alkalmazott biotechnológiai eljárások többségének az alapját a laboratóriumi körülmények között előállított embriók adják, vagyis szükség van jól működő IVP-rendszerre.

A sertésembriók – a bevezetőben említett – sokrétű felhasználását, azonban több tényező is limitálja. Az IVP-rendszer több helyen is módosításra, fejlesztésre szorul. Ezt jelzi, hogy a petesejtek érése az IVM során nem teljes: a sejtmag érését sok esetben nem követi a citoplazma maturációja; nagyfokú a polispermiás termékenyülések aránya az IVF során; továbbá az IVC alatt az embriófejlődés sem tökéletes: a hím pronukleusz képződése késik, vagy elmarad; késik az első osztódás is; a blasztomerek száma pedig általában nem éri el az *in vivo* embriókét.

Az eredmények javítása érdekében szükség van az *in vivo* és az *in vitro* körülmények összehasonlító vizsgálataira, az alkalmazott protokollok standardizálására, a tenyésztőoldatok fejlesztésére, a spermium-előkészítés fejlesztésére, a citoplazmába történő spermium-injektálás (ICSI) széles körű alkalmazására (Coy – Romar, 2002).

2.1.2. Petesejtek kinyerése

Lehetőség van élő állatból, ciklustól függetlenül kinyerni kumulusz–petesejt komplexeket (COC) az „Ovum Pick Up” (OPU) módszerrel. Erről, a minimálisan invazív petesejtnyerési technikáról az 1990-es években számoltak be elsőként (Brüssow et al., 1997; Kühholzer et al., 1997). Az eljárás lényege, hogy mikrotű, illetve az ahhoz kapcsolódó vákuumszivattyú segítségével ultrahangos és/vagy száloptikás ellenőrzés mellett, a folliculusfolnyadék aspirációjával nyerik ki a tüszőkből a petesejteket. Az így nyert COC-k alkalmasak arra, hogy a megfelelő morfológiai szelektálást követően *in vitro* termékenyítéssel belőlük embrió keletkezzen.

Az IVP-hoz szükséges petesejteket leggyakrabban a vágóhidakról könnyen beszerezhető petefészkekből nyerik. Ezek a petefészkek többnyire süldőkből származnak, és rajtuk számos 3–6 mm átmérőjű folliculus található, melyek éretlen petesejteket tartalmaznak – ezért az oocitákat a kinyerés után maturáltatni kell.

A petevezető átmosásával lehetőség van érett petesejtek kinyerésére is az ovulációt követően. Azonban ezek a sejtek általában rosszabb hatékonysággal használhatók IVP eljárásokban, mint az *in vitro* maturált petesejtek, mert ezeknek az oocitáknak a kora nem határozható meg pontosan és a sejtciklusuk sincs szinkronban (Rath, 1992).

1. táblázat: Az *in vivo* és az *in vitro* maturálódott petesejtek életképessége és felhasználhatósága [Laurincik et al., 1994]

Petesejt	Kumulusz – expanzió	Penetrációs ráta	Polispermia	Pronukleusz képződés
<i>In vivo</i> maturálódott	Teljes	70 % felett	5,7 %	Normális
<i>In vitro</i> maturálódott	Nem teljes	35 %	18,5 %	2 órás késés

Liu és Moor (1997) mutattak rá a petesejtkinyerés fontosságára a későbbi fejlődés szempontjából.

A legjobb minőségű COC-k a 3–5 mm átmérőjű folliculusokból származnak (Machatkova et al., 2004). Marchal és munkatársai (2002) vizsgálták a különböző méretű tüszőkből kinyert petesejtek fejlődési képességét *in vitro* körülmények között. Arra a következtetésre jutottak, hogy a 3 mm-nél kisebb átmérőjű tüszőkben lévő petesejteknek is megvan a képességük, hogy az IVF-t követően blasztocisztává fejlődjenek, hasonlóan a 3–6 mm átmérőjű folliculusokból származó petesejteknek; de ezek az embriók kevesebb blasztomeréből álltak, illetve százalékos arányuk is szignifikánsan alacsonyabb volt.

A tüszőkből a COC-k a folliculusok felvágásával (folliculus disszekció) vagy azok leszívásával (aspiráció) nyerhetők ki. A két eljárás hatékonyságáról ellentmondásos eredmények születtek.

Nagai és kutatócsoportja (1997) azt tapasztalta, hogy a tüszők felvágásával kinyert COC-k nagyobb része rekedt meg az IVM során csírahólyag (GV) stádiumban. Ezzel szemben, Liu és Moor szerint (1997) a sejtmag érése teljesebb volt, és az embrionális fejlődés is jobb volt azokban a csoportokban, ahol a COC-eket a tüszők felvágásával nyerték ki.

Az aspiráció történhet kézfecskendővel eljárással, illetve aspirációs készülékek használatával. Somfai (1999) összehasonlító vizsgálataiban nem talált statisztikailag igazolható különbségeket a hagyományos, kézfecskendővel kinyert petesejt-kinyerés, és az aspirációs készülékkel történő oocitagyűjtés IVM-ra gyakorolt hatása között. Humán IVP során szabályozható vákuummal működő aspirációs berendezéseket alkalmaznak, míg a sertés IVP esetén a kézfecskendővel kinyert aspiráció, illetve a folliculus disszekció a legelterjedtebb módja a COC-k gyűjtésének.

2.1.3. Petesejtek érése, *in vitro* maturációja (IVM)

Az IVP eljárás hatékonyságának szempontjából nagyon fontos a jó minőségű kumulusz–petesejt komplexek használata. A kinyert COC-k szelektálása az IVP sikerére nézve döntő fontosságú (Torner et al., 1998). A vizsgálat sztereomikroszkóp segítségével végezhető el. Azok a COC-k használhatók fel az IVM/IVF során, melyek kompakt, több rétegű kumuluszállománnyal rendelkeznek, citoplazmájuk sötét színű, és homogén. Nagai (1994) vizsgálatai szerint azok a COC-k a legalkalmasabbak, melyek 15×10^3 kumuluszsejtet tartalmaznak.

A kumuluszállomány szerepét a petesejtek fejlődésében több kutatócsoport is megerősítette (Motlik et al., 1986; Mattioli et al., 1988; Laurincik et al., 1992; Tanghe et al., 2002; Somfai et al., 2004; Maedomari et al., 2007). A kumuluszsejtek segítik a sejtmag és a citoplazma érését, ezáltal szerepet játszanak a hím előmag képződésében, a monospermiás termékenyülésben és a korai embrionális fejlődésben is (Nagai et al., 1994). A kumuluszsejtek az ovulációt követően több ellenőrző mechanizmusban vesznek részt, melyek irányítják a spermium petesejtbe hatolását (Carell et al., 1993), illetve a termékenyülés során szelektálják a morfológiailag abnormális és a nem kapacitálódott spermiumokat (Cherr et al., 1986). Szerepük van a kapacitáció folyamatában, ugyanis az általuk kiválasztott fehérjékkel speciális mikrokozmoszt alakítanak ki a hímivarsejtek számára (Ball et al., 1985).

Maturációnak a sejtmagban és a citoplazmában, a meiózis első profázisa és a meiózis második metafázisa között fellépő változásokat nevezik. Az érett, (metafázis-II, M-II) petesejtek alkalmasak a monospermiás termékenyülésre (Wehrend – Meinecke, 2001). Az *in vitro* embrió-előállító rendszer egyik legfontosabb lépése a petesejtek maturáltatása (IVM). Az IVM hatással van a termékenyülésre, a pronukleusz-képződésre és az embrionális fejlődésre.

Hunter és Polge (1966) írta le elsőként, hogy *in vivo* körülmények között a petesejtek 38–42 órával a preovulációs LH–csúcsot követően maturálódnak. Ez megközelítőleg az ovuláció idejével esik egybe – amikor a petesejtek M-II stádiumba kerülnek.

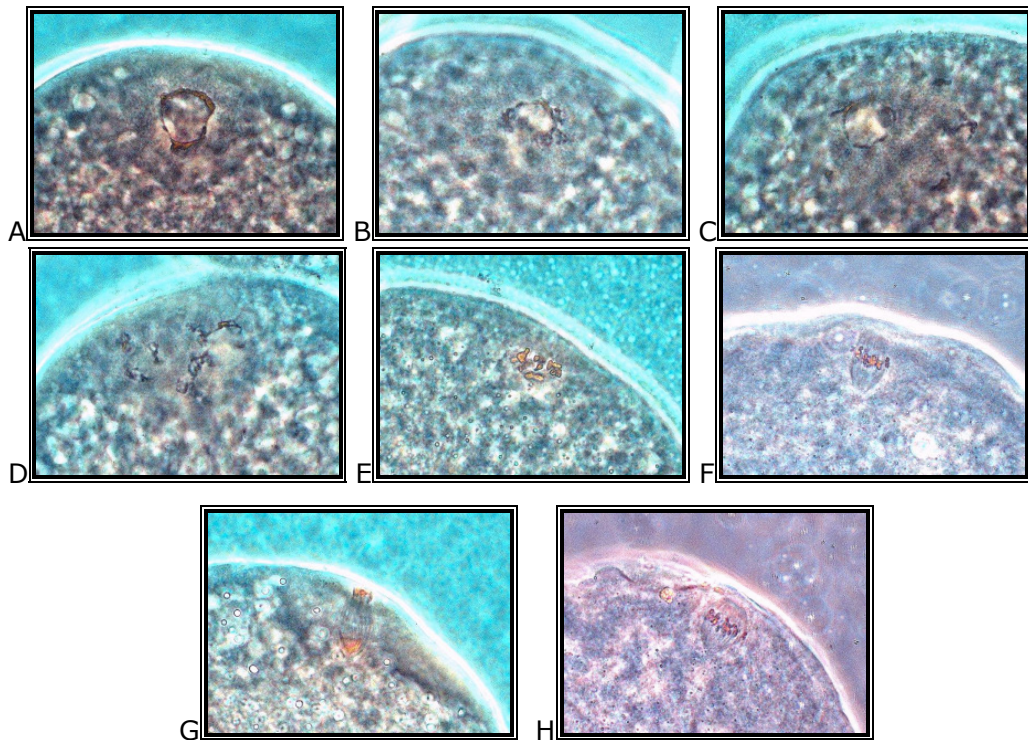
In vitro azonban a sertés petesejtek maturációja 36–50 óra alatt következik be (Yoshida et al., 1990). Ismeretes, hogy laboratóriumi körülmények között a maturáció a legsikeresebben 38–39 °C-on, 5 % CO₂ tartalmú légtérben megy végbe (Wu et al., 1992).

Az IVM eredményessége szempontjából nagyon fontos az alkalmazott gázkeverék megfelelő oxigéntartalma. Kikuchi (2002) olyan IVM rendszert dolgozott ki, melyben a hagyományos, 20 helyett, 5 % oxigéntartalmú gázkeverékben maturáltatta a petesejteket. A magas oxigéntartalom nagy mennyiségű reaktív oxigéngyököt (ROS) eredményezhet, ami lipidperoxidációt, enzimek inaktiválódását és sejtkárosodásokat okozhat. A ROS mennyisége azonban kisebb oxigéntartalom mellett csökken. Kikuchi

nem talált különbséget a sejtmag érése és a blasztociszta arány tekintetében az 5 % és a 20 % O₂-tartalmú légtérben maturáltatott petesejtek esetében, azonban a blasztociszták jobb minőségűek voltak 5 % oxigéntartalom mellett (a blasztomerek száma: 43,5 illetve 37,8 volt).

A sejtmag érése során bekövetkezik a germinális vezikulum (csírahólyag, GV) feloldódása (GVBD). A petesejtek M-II stádiumba jutnak és így maradnak a termékenyülésig, akkor ugyanis a behatoló spermium hatására az oocita aktiválódik, és képes lesz a meiózis folytatására. A sejtmag érését követi a citoplazma érése, és a kumuluszsejtek változásai.

In vitro körülmények között a sejtmag érését a petesejtek fixálásával, festésével, mikroszkóp segítségével, 400 × nagyítással lehet meghatározni.



1. kép: A sejtmag meiotikus érése során bekövetkező változások: GV-I (A), GV-II (B), GV-III (C), GV-IV (D), GVBD (E), M-I (F), A-I (G), M-II (H).

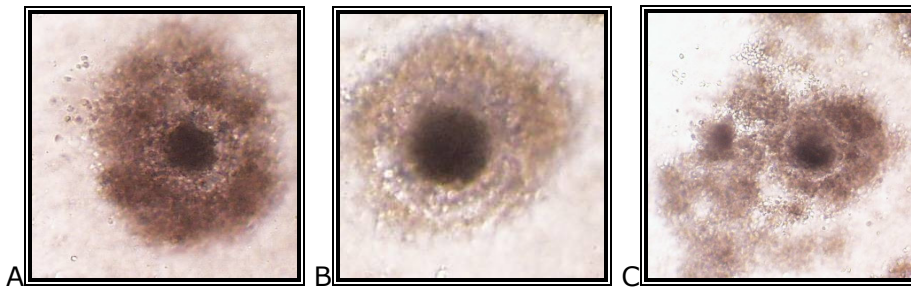
[Saját felvétel]

A citoplazma érése jelenleg még nem teljesen ismert folyamat. Annyit tudunk, hogy a citoplazmában több olyan esemény történik, melyek meghatározó jelentőséggel bírnak a petesejtek fejlődőképességére nézve.

Ilyen folyamatok pl. az mRNS-ek és bizonyos fehérjék felhalmozódása, a citoskeleton és egyes sejtorganellumok újraszerveződése, a sejtek anyagcseréjének megváltozása, a kortikális granulomok migrációja a zona pellucidához (ZP), illetve az intracelluláris glutationszint megemelkedése. Összefoglalóan ezeket a változásokat nevezik a citoplazma érésének (Krisher et al., 2007).

Coy és munkatársai (1998) szerint nincs szoros kapcsolat a sejtmag és a citoplazma érése között; a két folyamat egymástól függetlenül zajlik.

A citoplazma érését az ooplazma megemelkedett glutation (GSH) szintje és a kumuluszsejtek expandálódása jelzi (Yoshida et al., 1993b).



2. kép: Kumuluszsejtek morfológiai változása az érés során: kompakt kumuluszállomány (A); expandálódó kumuluszállomány az IVM 24. órájában (B), expandálódott kumuluszállomány az IVM 44. órájában (C)

[Saját felvétel]

A maturációs oldat összetevőinek a petesejtek érésére gyakorolt hatását több kutatócsoport vizsgálta és vizsgálja ma is (Funahashi – Day, 1993; Abeydeera et al., 1999; Kikuchi et al., 2002; Marques et al., 2007).

A leggyakrabban alkalmazott IVM-oldatok a következők: TCM-199 (Mattioli et al., 1989; Yoshida et al., 1990), Waymouth médium (Yoshida et al., 1992a), Whitten's oldat (Funahashi et al., 1994a), TLP (Yoshida et al., 1993a), NCSU-oldat (Petters – Wells, 1993), NCSU-23 és NCSU-37 médium (Wang et al., 1997a).

Vannak oldatok, melyek szérum-kiegészítést igényelnek, azonban Abeydeera (2000) kutatásai szerint a maturáció szérum nélküli oldatokban a legsikeresebb.

Mattioli (1989) vizsgálataiban rámutatott a sertés follikulusfolyadék (PFF) fontosságára. Szerinte a PFF fenntart egyfajta anyagcsere-kapcsolatot a kumuluszsejtek és a petesejtek között, ezáltal segítve a teljes citoplazmás érést. A PFF-et a tüsző sejtjei és a petesejt választják ki; növekedési faktorokat (EGF, IGF, NGF, TGF), elektrolitokat, hormonokat, aminosavakat, inhibin, aktivin és eddig ismeretlen egyéb faktorokat tartalmaz (Yoshida et al., 1992b; Knight – Glister, 2001; Abeydeera, 2002; Hong et al., 2004).

A maturáció során alkalmazott EGF-, IGF-, β -merkaptoetanol-kiegészítés jó hatással volt a termékenyülést követő embriófejlődésre (Xia et al., 1994; Abeydeera et al., 1999). Singh és kutatócsoportja (1997) mutatott rá, hogy az EGF csökkenti a termékenyüléskor előforduló polispermia arányát. Bali Papp (2005) 1 ng/ml NGF kiegészítést alkalmazott az IVM oldatok esetében; tapasztalatai szerint az NGF gyorsította a sejtmag érését, azonban az IVF-t követő embrionális fejlődésre nem volt hatással.

Feltételezhető, hogy a PFF petesejtekre gyakorolt hatása függ attól is, hogy a follikulusfolyadékot mekkora tüszőkből nyerték ki, illetve attól, hogy a petesejtek mekkora follikulusokból származnak (Machatkova et al., 2004). Prochazka (2003) kimutatta, hogy az EGF serkentő hatással volt azoknak a COC-knek a kumulusz–expanziójára, melyek 6 mm átmérőjű follikulusokból származtak, azonban a 3 mm átmérőjű tüszőkből származó COC-k kumulusz–expanziójára nem volt hatással. A nagyobb (5–6 mm) átmérőjű tüszőkből származó PFF szignifikánsan gyorsította a sejtmag érését, és javította a termékenyülési rátát, mint a kisebb (3–4 mm) átmérőjű tüszőkből nyert PFF (Yoon et al., 2000). Ito (2007) szerint a nagyobb tüszőkből származó PFF-ban vannak bizonyos, 30–100 kDa tömegű fehérjék, melyek kedvezően hatnak a sejtmag és a citoplazma érésére. A sejtmag érése és a sarkitest kilökődésének gyorsasága, továbbá az idő, melyet a petesejt M-II stádiumban tölt el, hatással vannak a petesejt későbbi fejlődőképességére (Krisher – Bavister, 1999; Balakier et al., 2004). A gyakorlatban az IVM oldatok 10 % PFF-al történő kiegészítése terjedt el.

Nagai (1993) follikulusfalból származó sejtekkel egészítette ki az IVM-médiumot, melynek hatására a rosszabb minőségű COC-k is nagy arányban maturálódtak.

A glutation (GSH) fontos biológiai funkciókat lát el a sejtben: részt vesz a sejtek proliferációjában, az aminosavak transzportjában, a fehérjék szintézisében, diszulfidok redukálásában, a szomatikus sejtek és a gaméták oxidatív stressztől való védelmében (Kosower et al., 1978; Meister et al., 1983; Lubberda et al., 2005). A GSH-szintézis – a maturáció során – a spermium–kromatin dekondenzálódásának előfeltétele, továbbá szerepe van a hímivarsejt penetrálódását követően a hím előmag formálódásában is (Nagai et al., 1994; Maedomari et al., 2007). Wang (2002) vizsgálatai szerint a maturációs oldatok GSH-val történő kiegészítése nagyobb blasztociszta arányt eredményezett. Az IVM-oldatba adagolt ciszteint, ciszteamint, glicint és glutaminsavat a kumuluszsejtek képesek glutationná alakítani, és a gap junction sejtkapcsoló rendszereken keresztül a petesejtbe juttatni, így növelve az intracelluláris GSH-tartalmat (Mori et al., 2000; Bing et al., 2002). Yoshida (1992a; 1993b) hasonló GSH-szint emelkedést tapasztalt, amikor az IVM során alkalmazott médium NaCl tartalmát csökkentette és az oldathoz β -merkaptoetanol adott.

Kun (2007) legújabb vizsgálatai az IVM-oldatok leptinnel történő kiegészítését javasolják. A leptin egyike a nagyrészt a fehér zsírszövet által termelt citokinszerű, 16 kDa méretű protein hormonoknak. Egyik fontos

életteni szerepe, hogy a metabolikus szignálmechanizmus részeként tájékoztatja a tápláltsági állapotról az ivari működést centrálisan szabályzó, a hipotalamuszban lokalizált GnRH-termelő neuronokat, továbbá szerepet játszik a reprodukciós folyamatokban is (Zhang et al., 1994; Yang et al., 2006). Laboratóriumi rágcsálókön és főemlősökön végzett vizsgálatok arról tanúskodnak, hogy a plazma leptin szintjét az életkor, az ivar, a szaporodásbiológiai státusz (ivarérés, vemhesség, laktáció, ellés utáni időszak), továbbá az egészségi állapot is befolyásolja (Kulcsár, 2007). A leptint kimutatták emberi petesejtekben, granulózasejtekben és a tüszőfolyadékban is (Cioffi et al., 1997).

A butirolakton-I (Wu et al., 2002), a cikloheximid (Ye et al., 2005), a dibutil-ciklikus-adenozin-monofoszfát (dbcAMP; Somfai et al., 2003), a rozkovitin (Ju et al., 2003; Romar – Funahashi, 2006) és a 6-dimetilaminopurin (Le Beux et al., 2003) hozzáadása az IVM-oldatokhoz a maturáció első 20 órájában, alkalmas a maturáció (a petesejtek meiotikus érésének) szinkronizálására. Ezek a vegyületek reverzibilisen gátolják a meiózis folytatását, nem engedik a csírahólyag lebomlását (GVBD). A butirolakton-I és a rozkovitin azonban nem javított az oociták későbbi fejlődésén, míg a dbcAMP és a fehérjeszintézis-gátló cikloheximid esetében nagyobb blasztociszta arányt jegyeztek fel (Ye et al., 2005).

Az IVM-oldatok hormonokkal történő kiegészítése döntő fontosságú a maturáció szempontjából. A kilencvenes években Mattioli (1991) az IVM-oldatok ösztradiol-kiegészítésének petesejtek érésre gyakorolt pozitív hatásáról számolt be. Az elmúlt időszakban több kutatás irányult a különböző hormonok IVM-ra gyakorolt hatásának vizsgálatára (Meinecke et al., 1979; Funahashi et al., 1994a; Bruce et al., 2007; Sirard et al., 2007).

Az FSH kedvezően hat a kumulusz-expanzióra, míg az LH és a hCG nincs hatással a petesejt és a kumuluszsejtek kapcsolatára (Funahashi et al., 1994a). Az IVM során a petesejtek éréséhez szükséges hormonális viszonyok változóak. Az érés első részében az oldathoz adagolt PMSG, illetve hCG növeli a maturációs rátát (80–89 %), a penetrációs rátát (86–99 %) és a hím pronukleusz-képződés arányát (63–72 %) a kezeletlen csoportokhoz képest. Az IVM második felében az oldathoz adagolt PMSG azonban nem volt hatással a penetrációs rátára, sőt a pronukleusz képződésre negatívan hatott (34 %). A PMSG a maturáció 20. órájától a kumuluszállomány petesejtről való leválását indukálta. Ezek alapján Funahashi és Day (1993) megállapították, hogy az érés első 20 órájában a PMSG (FSH) jelenléte esszenciális, az érés második felében viszont annak hiánya válik létfontosságúvá.

2.1.4. Spermiumok előkészítése a termékenyítéshez (*in vitro* kapacitáció)

A termékenyüléshez kapacitálódott spermiumra és érett petesejtre van szükség.

A fő lépések, melyeken a spermium keresztülmegy, mielőtt a petesejtbe hatolna, a következők: átjutás a corona radiatán, kapcsolódás a zona pellucidához (ZP), akroszóma–reakció, bejutás a perivitellinális térbe, végül kapcsolódás és fúzió a petesejt plazmamembránjával.

Austin (1951) és Chang (1951) fedezték fel, hogy a spermiumok csak akkor képesek *in vitro* kísérletekben megtermékenyíteni a petesejtet, ha előtte meghatározott ideig a női nemi utakban voltak. Feltételezték, hogy a spermiumokban végbemennek bizonyos változások, melyek feltétlen szükségesek termékenyítő-képességük elnyeréséhez. A folyamatot kapacitációnak (kapacitál=rábír, ösztökél) nevezték el. Rámutattak arra, hogy a spermiumoknak át kell esniük ezen a komplex fiziológiai folyamaton –ami biokémiai, biofizikai és anyagcsere-változásokat foglal magában–mielőtt képessé válnak a petesejthez kapcsolódásra.

A kapacitáció folyamata napjainkban még nem teljesen ismert. Annyit tudunk, hogy a spermium elveszít bizonyos, a szeménális plazmából és a mellékheréből származó gátló fehérjét (Lamirande et al., 1997), továbbá változások történnek a citoszkeletonban is. A membrán lipid- és fehérje szerkezete megváltozik, aminek következtében az akroszóma membránjai destabilizálódnak, amely a később lejátszódó akroszóma–reakció feltétele. A spermium és a peteburok kapcsolódását szolgáló kötőhelyek szabaddá válnak a külső akroszóma membránon. A citoplazmában megnő a Ca^{2+} és a HCO_3^- ionok mennyisége. A kapacitáció kulcsmolekulájának a bikarbonátot tartják – valószínűleg ez indukálja a membrán lipidszerkezetének változásait is (Harrison et al., 1997). Nő az adenil-cikláz aktivitása, és növekszik a sejten belüli ciklikus adenozin-monofoszfát (cAMP) mennyisége is, továbbá csökken az intracelluláris pH. A cAMP a protein kináz-A aktiváláson keresztül fehérjéket foszforilál, melynek következtében megváltozik a spermiumok mozgása. Úgynevezett hiperaktív mozgás lesz jellemző rájuk: a fark gyors, hullámzó, erőteljes csapásokkal mozgatja előre a spermiumot. Ehhez az energiát a fokozott glikolízis biztosítja; a hímivarsejt metabolikusan aktívabbá válik.

A kapacitációban fontos szerepe van a petevezető–epitélium által termelt petevezető–folyadék (OF) (Parrish et al., 1989). Az OF összetétele nem állandó a petevezető különböző szakaszain; mennyisége, összetevői fajoként változóak, sőt, ciklustól függően, hormonális hatásra is eltérően alakul. Legnagyobb mennyiségben az ösztrusz során termelődik (Leese, 1988). Fehérjében gazdag (Killian, 2004), bikarbonát-tartalma 35–90 mM (Leese et al., 2001). A sertés és a szarvasmarha OF nagy mennyiségben tartalmaz glükózamino-glikánokat, szulfátokat (kondroitin-szulfát, kreatin-szulfát, heparin-szulfát), heparint, hialuronsavat (Lee et al., 1984) – ezek a vegyületek nemcsak a kapacitáció folyamatában fontosak, hanem szerepet

játszanak a spermiumok életképességének fenntartásában is (Rodriquez-Martinez et al., 2001).

Az emlősállatok petevezetője megfelelő környezetet biztosít a gaméták transzportjához, a spermiumok tárolásához és kapacitációjához, a petesejtek maturációjához, a termékenyüléshez és az azt követő korai embrionális fejlődéshez (Hunter et al., 2004).

In vivo vizsgálatok alapján úgy tűnik, hogy sertés esetében a kapacitáció a petevezető caudális szakaszán lévő spermarezervoárban történik, majd ovulációkor a spermiumok folytatják útjukat az ampulla felé a kapacitáció/hiperaktív mozgás következtében (Hunter – Nichol, 1988; Yanagimachi et al., 1994). *In vivo* esetben a folyamat hossza állatfajonként változó, általában 5–7 óra (sertés: 3 óra).

In vitro körülmények között a petevezetőhöz hasonló mikrokörnyezetet kell biztosítani a spermiumok számára, mert a kapacitáció a termékenyülés szempontjából esszenciális. A petesejtek csak a kapacitálódott spermiumok felismerésére képesek, és csak a kapacitáción átesett spermiumok tudnak megfelelő módon reagálni (akroszóma–reakció) az oocita jeleire (Töpfer-Petersen et al., 2000). Laboratóriumi körülmények között a kapacitáció preinkubálással szimulálható (Nagai et al., 1984). Centrifugálással, többszöri mosással a spermiumok felszínéről eltávolíthatók a szeminális plazmából származó gátló fehérjék (Yoshida et al., 1993a), majd általában bikarbonátban gazdag oldatokban inkubálva stimulálhatók a kapacitáció során zajló események (Gadella et al., 2004).

Cheng (1986) vizsgálatai szerint a mellékhere farkából származó hímivarsejtek könnyebben kapacitálódnak, mint az ejakulált spermiumok – ennek az a magyarázata, hogy az epididimális spermiumok még nem találtak a szeminális plazmában jelen lévő dekapacitáló faktorokkal. Azonban, mivel viszonylag nehéz hozzájutni a mellékheréhez, több kutatócsoport az ejakulált spermiumok használata mellett döntött (Yoshida et al., 1993a; Abeydeera – Day, 1997; Suzuki et al., 2005).

Nagai (1988) mellékheréből származó, fagyasztott/visszaolvasztott spermiumokkal sikeres IVF-et hajtott végre. Fagyasztott sperma használatakor rövidebb inkubálási időre van szükség, mert a megfigyelések szerint a elő-inkubáció ideje alatt a hímivarsejtek motilitása gyorsan csökken (Clarke – Johnson, 1987).

Zheng (1992) vizsgálatai alapján javasolja a fagyasztott sperma használatát az IVF során. Tapasztalatai szerint a fagyasztott/visszaolvasztott kanspermával közel azonos penetrációs arány, és több monospermias termékenyülés érhető el, mint a friss, ejakulált sperma használatakor.

Sertés esetében az első sikeres *in vitro* penetrációról Pavlok (1981) számolt be. A spermiumokat többször centrifugálta, majd nagy koncentrációban előinkubálta magas Ca^{2+} -koncentrációjú oldatban a kapacitáció segítése céljából. Cheng-nek (1985) Pavlok protokollját némileg módosítva sikerült malacokat produkálnia IVF segítségével.

Az IVF-rendszer hátránya az *in vivo* termékenyüléssel szemben, hogy *in vitro* körülmények között a spermiumok szelektálása elmarad. Érdekes és sikeresnek tűnő próbálkozásokat közöltek arra nézve, hogy az IVF során modellezzék az *in vivo* viszonyokat, így a női nemi traktus szelektáló hatását. Példa erre Funahashi és Nagai (2000) újítása. Ők speciális tenyésztőedényt fejlesztettek ki sertés IVF számára, melyben fallal leválasztott részbe injektálták a hímivarsejteket. Onnan csak a megfelelő motilitással rendelkező spermiumok tudtak eljutni a fal másik oldalán lévő érett petesejtekig. Ez a technikai újítás nem terjedt el széles körben, mert a speciális edény előállítása körülményes, nehezen megoldható feladatnak tűnik. Egy másik, könnyebben adaptálható módszert dolgozott ki 2003-ban Li és kutatócsoportja. Ők a hagyományos sperma-mélyhűtésre használt 0,25 ml-es műszalmát töltötték meg fertilizációs tápoldattal, majd a szalma egyik végébe helyezték a petesejteket és a másik végébe a hímivarsejteket. A petevezető ilyen modellezésével szignifikánsan csökkent a polispermia aránya, míg nem történt változás az összes termékenyült petesejt arányában.

Az ondóból a szeminális plazma dekapacitáló faktorainak, a higítónak illetve a krioprotektív anyagoknak az eltávolítására több módszer is rendelkezésre áll: Swim up eljárás, Percoll-kezelés, Sephadex-gél filtráció (Steen et al., 1965), Glass bead columns-teszt (Daya et al., 1987).

1989-ben Mattioli a humán IVF során alkalmazott Percoll-kezelést adaptálta gazdasági állatokra. A Percoll oldat 15–30 mm átmérőjű szilícium-dioxid kolloid részecskékből áll, amit polivinil-pirrolidonnal vontak be. Annak ellenére, hogy napjainkban a humán IVP rendszerben már nem alkalmazzák, gazdasági állatok esetében széles körben elterjedt a használata a kapacitáció elősegítése céljából. A Percoll-kezelés lehetővé teszi ugyanis a motilis és a kevésbé motilis spermiumok gyors, hatékony szétválogatását (Ng et al., 1992).

A Swim up (felúsztatásos) módszerrel szintén a spermiumok motilitása alapján végezhető el a szelekció. A módszert Parrish és Foote (1987) dolgozta ki 20 évvel ezelőtt. A hímivarsejteket 1 ml TALP oldat alá rétegezik, majd 1 órán keresztül inkubálják 38,5 °C-on. A motilis spermiumok felúsznak a TALP oldatba – a termékenyítéshez a felülúszóban lévő spermafrakciót használják.

A spermiumok termékenyítő-képességének előrejelzésére használható a „peteburok kötődési teszt” (ZBA). A vizsgálat során a zona pellucidához kötődő spermiumok száma állapítható meg. Sertés esetében a módszerről elsőként 1995-ben jelent meg közlemény (Fazeli et al., 1995).

Napjainkban azonban még mindig sok a meg nem válaszolt kérdés a legalkalmasabb spermakezelési eljárással kapcsolatban.

2.1.5. In vitro termékenyítés (IVF)

Az első IVP-malac megszületése (Cheng, 1985) óta eltelt több mint 20 évben számos kutatócsoport beszámolt már IVP-malacok születéséről (Yoshida et al., 1993a; Rath et al., 1996; Abeydeera et al., 1998; Wu et al., 2004; Suzuki et al., 2006; Katayama et al., 2007).

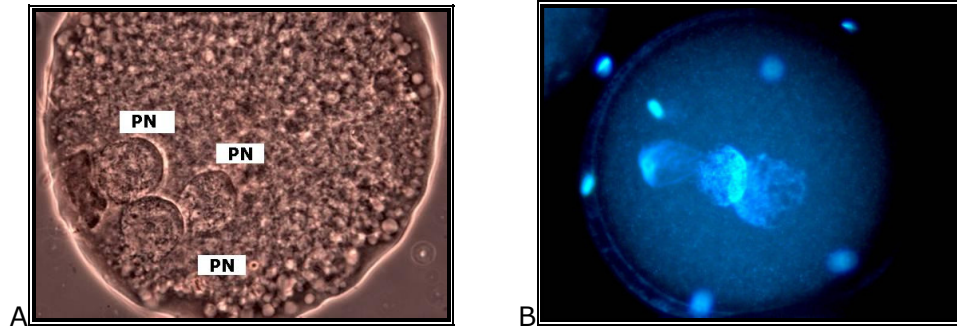
Napjainkban az IVF fejlesztése érdekében több kutatócsoport végez vizsgálatokat világszerte. A polispermia magas aránya, az IVF-embriók rossz minősége (Macháty et al., 1998) jelzi, hogy a rendszer még mindig nem tökéletes.

A sertés IVF-rendszer hatékonysága nem éri el a szarvasmarha és a juh IVF-rendszereit. Sertés esetében a különböző kutatócsoportok nagyon változatos (20–95 %) penetrációs eredményekről számoltak be (Rath – Niemann, 1997). Hasonlóan változatos képet mutat a polispermia előfordulása is: 30–95 % (Gil et al., 2007) – ezek az eredmények szintén jelzik, hogy a rendszer fejlesztésre szorul.

Az IVF-eljárásban meghatározó tényező az egy petesejtre jutó spermiumok száma (Xu et al., 1995; Gil et al., 2004), a koinkubáció idejének hossza (Coy et al., 1993b), a hímvarsejtek eredete: ejakulált vagy epididimális; friss vagy fagyasztott/visszaolvasztott (Kikuchi et al., 1998). Mindezek mellett nagyon fontos a kultiváláshoz alkalmazott oldat összetétele (Martinez et al., 2001) és mennyisége (Gil et al., 2003), ami nagy hatással van a penetrációra és a normális termékenyülésre.

Elsőként Cheng (1986) mutatott rá, hogy a sertés IVF fő problémája a polispermia előfordulásának nagy aránya. A kérdést azonban nemcsak a spermium, hanem a petesejt oldaláról is meg kell vizsgálni.

Az IVM-rendszer meghatározó jelentőségű az IVF sikerességét tekintve (Niwa, 1993). Az *in vitro* maturálódott petesejtek esetében részben a nem teljes citoplazma-érés tehető felelőssé azért, hogy a petesejtekben a kortikális granulomok (CG) migrációja a zona pellucida (ZP) alá még nem fejeződött be és a CG-k exocitózisa sem tökéletes (Cran – Cheng, 1986). Azonban a polispermia nagy aránya nemcsak a citoplazma érésének hiányosságaihoz van összefüggésben, hanem a ZP szerkezetének megváltozásával is kapcsolatban áll. *In vivo* körülmények között a ZP glikoproteinjeinek összetétele a petevezető-transzport során megváltozik; a petesejtek kapcsolatban vannak a petevezető által kiválasztott fehérjékkel, melyek segítik a ZP szerkezetének átalakulását a penetrációt követően (Hedrick et al., 1987). Az IVM-petesejtek esetében az oocita egyik polispermia ellen védő mechanizmusának, a zona-reakciónak a késéséről számoltak be (Cheng et al., 1986; Wang et al., 1997b), illetve a ZP fehérjeszerkezetének megváltozása el is maradhat *in vitro* körülmények között (Coy et al., 1992).



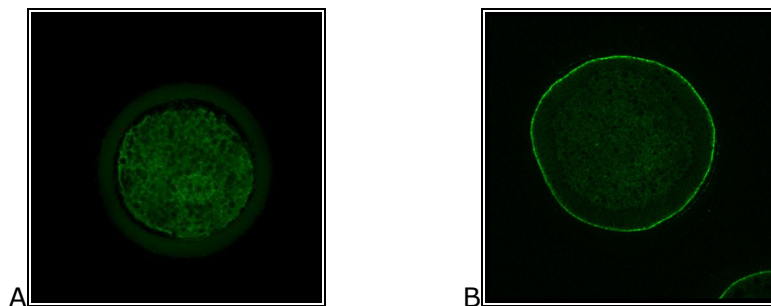
3. kép: Polispermia jelensége: sertés petesejtek három pronukleusszal (PN), orcein festést követően (A); Hoechst 33342 festést követően (B)

[Saját felvétel]

A nem megfelelő minőségű COC-k használata, a hiányos kumuluszréteg is szerepet játszik a polispermias termékenyülésekben (Laurincik et al., 1994).

Napjainkban egyre több kutatócsoport vizsgálja a petevezető-folyadék (OF) hatását a maturációra és a termékenyülésre. Kim és csoportja (1997) 10 és 30 %-ban sertés OF-t tartalmazó oldatban inkubálta a petesejteket 90 percen keresztül, az IVF-et megelőzően. Azt tapasztalták, hogy a penetrációs ráta nem csökkent, ugyanakkor a monospermias termékenyülések száma nőtt. Suzuki és munkatársai (2000) szerint az OF-ban legnagyobb mennyiségben jelen lévő glükózamino-glikán, a hialuron csökkenti a polispermias termékenyülések arányát.

Azonban nemcsak az OF-nak van polispermiát csökkentő hatása: a petevezető epiteliális sejtjei szekretálnak bizonyos polipeptideket, melyeknek hasonló hatásáról Nagai és Moor (1990) számoltak be. Ők az IVF-et megelőzően a spermiumokat petevezetőből származó sejtekkel 2,5 órán keresztül együtt inkubálták, és az IVM-petesejteket szintén petevezetőből származó sejteket tartalmazó IVF-oldatban termékenyítették. A kontroll csoporthoz viszonyítva 40–50 %-kal alacsonyabb polispermiáról számoltak be.



4. kép: Kortikális granulumok helyeződése sertés petesejtekben: nem maturálódott petesejt (A), maturálódott oocita (B) (FITC–PNA fluoreszcensz festés) [Saját felvétel]

A polispermiát befolyásoló egyéb tényezők még: az IVF során alkalmazott spermium-koncentráció nagysága, a koinkubálás ideje és az alkalmazott IVF-médiumcsepp mennyisége.

Az egyes kutatócsoportok által használt IVF-rendszerekben nem egységes a termékenyítő médiumcsepp térfogata: 0,1 ml-től egészen az 5 ml-ig terjed. (Mattioli et al., 1989; Laurincik et al., 1994; Ashworth et al., 1994; Abeydeera – Day, 1997).

Gil (2003) vizsgálatai szerint az alacsony térfogat (0,1–1 ml) IVF oldat és ebben 30–50 petesejt koinkubálása, 2000 hímivarsejt/petesejt arányban eredményezte a legjobb fertilizációs rátát.

2. táblázat: Az IVF során alkalmazott médium mennyiségének és a petesejtek számának hatása a termékenyülésre és az embriók fejlődésére [Gil et al., 2003]

IVF-oldat (ml)	Petesejt / IVF oldat (db)	Monospermiás termékenyülés (%±SEM)	Embriófejlődés (%±SEM)	Blasztociszta arány (%±SEM)
2	50	50,1 ± 4,8	64,3 ± 3,1	18,9 ± 2,0
2	30	57,9 ± 5,8	73,1 ± 4,1	26,4 ± 3,6
2	15	64,1 ± 5,8	66,4 ± 3,7	14,3 ± 2,8
1	50	58,8 ± 4,4	69,8 ± 2,3	22,3 ± 0,9
1	30	60,5 ± 5,0	69,8 ± 2,3	26,2 ± 5,5
1	15	72,2 ± 5,1	63,5 ± 3,5	21,2 ± 0,8
0,1	50	58,2 ± 4,8	75,7 ± 6,4	32,5 ± 7,1
0,1	30	65,5 ± 3,5	71,9 ± 1,2	31,8 ± 3,1
0,1	15	63,7 ± 8,8	75,7 ± 1,0	23,8 ± 1,4

Ismert, hogy az IVF során nagyobb számú spermium jut el a petesejthez, mint *in vivo* körülmények között. A spermiumok koncentrációjának csökkentésével a polispermia előfordulása is mérsékelhető – azonban ebben az esetben a penetrációs ráta is alacsonyabb (Coy et al., 1993a).

Sertés spermiumok esetében gyakori a spontán akroszóma-reakció, ami több spermium petesejtbe való penetrálódásához vezethet (Sun et al., 1992; Wang et al., 1998). A legtöbb IVF rendszerben 6 órás koinkubációs idővel dolgoznak (Kikuchi et al., 2002; Yoshioka et al., 2003).

A közelmúltban azonban kifejlesztettek egy új módszert, melyben a petesejteket és a spermiumokat 10 percig együtt inkubálják IVF-oldatban, majd a sejteket koffein-tartalmú IVF-médiumban megközelítőleg 5 órán

keresztül inkubálják (Gruppen – Nottle, 2003). Ezzel a módszerrel sikerült csökkenteni a polispermia előfordulásának arányát.

A koinkubáció idejének hossza – vagyis a petesejtek és a spermiumok együtt inkubálása az IVF során – összefüggésben van az alkalmazott spermium-koncentrációval.

A koinkubáció idejével és a spermium-koncentrációval kapcsolatban azonban nincs egységes vélemény: Coy és kutatócsoportja (1993b) 4 órás koinkubációt javasol 2×10^6 hímivarsejt/ml IVF-oldat esetében, ezzel szemben Koo és csoportja (1997) az $1,2 \times 10^5$ spermium/ml koncentrációt találta a legjobbnak 6 órás koinkubáció mellett.

Gil (2007) vizsgálatai szerint az IVF során 500 spermium/petesejt arány esetén 6 órás koinkubációra volt szükség, míg 2000, 1500 és 1000 db spermium/petesejt esetében elegendő volt a 10 perces koinkubálás. A penetrációs ráta mindegyik esetben közel azonos volt.

3. táblázat: Spermiumkoncentráció hatása sertés petesejtek termékenyülésére [Gil et al., 2007]

^a Polispermias petesejtek százalékos aránya a penetrálódási ráta százalékában kifejezve.

^b Hím pronukleusszal rendelkező petesejtek százalékos aránya a penetrálódási ráta százalékában kifejezve.

Spermium (db/ml)	Petesejt			Petesejtbe penetrálódott spermiumok száma (db)
	Penetrálódási ráta (%)	Polispermia ^a (%)	Hím előmag jelenléte ^b (%)	
$0,6 \times 10^5$	$62,4 \pm 1,8$	$24,4 \pm 1,6$	$95,6 \pm 1,7$	$1,1 \pm 0,2$
$1,2 \times 10^5$	$90,2 \pm 1,3$	$48,3 \pm 1,5$	$93,8 \pm 2,3$	$1,5 \pm 0,2$
$2,5 \times 10^5$	$94,5 \pm 1,3$	$70,3 \pm 2,0$	$94,1 \pm 1,4$	$2,0 \pm 0,3$
5×10^5	$95,9 \pm 1,8$	$85,8 \pm 1,3$	$95,6 \pm 0,4$	$2,5 \pm 0,4$

Az IVF-hoz leggyakrabban alkalmazott tápoldatok a következők: TCM-199 (Mattioli et al., 1988), TALP-médium (Coy et al., 2000), TBM-oldat (Han et al., 1999). Az IVF-oldatok többsége koffeint tartalmaz, mert a koffein megemeli az intracelluláris cAMP-szintet – a ciklikus-nukleotid-foszfordiészteráz enzimaktivitás gátlásán keresztül –, és indukálja sertés hímivarsejtek kapacitációját (Casillas – Haskins, 1970), ugyanakkor spontán akroszóma-reakciót válthat ki. Funahashi és Nagai (2000) megállapították, hogy a koffein-tartalmú oldatban történő hosszú (6 órás) inkubáció növeli a polispermias termékenyülések arányát.

A közelmúltban Yoshioka és kutatócsoportja (2003) kifejlesztett egy új IVF-oldatot (PGM), melyet ciszteinnel, adenzinnal kiegészítve magasabb monospermiás termékenyülési rátát értek el. Az adenzin (koffein jelenlétében) a hialuronsavhoz hasonlóan stimulálja a kapacitációt, ugyanakkor gátolja a spontán akroszóma-reakciót a fagyasztott/visszaolvasztott és a frissen levett kan spermiumok esetében (Suzuki et al., 2002). Tatemoto (2005) vizsgálatai szerint, a kondroitin-szulfát A-ból nyert bizonyos oligoszacharid – a spermium hialuronidáz-aktivitás gátlásán keresztül – növelte a monospermiás termékenyülések arányát, és csökkentette a ZP-hoz kapcsolódó hímivarsejtek számát.

A rendszer fejlesztésének egyik lehetséges módja a citoplazmába történő spermajektálás (ICSI) is, amit humán IVP esetében alkalmaznak (Catt – Rhodes, 1995; Martin, 2000; García-Casello et al., 2006).

2.1.6. In vitro kultivációs rendszer (IVC)

In vivo körülmények között a termékenyülést követő 5. órában a petesejtbe penetrálódott spermium kromatinja dekondenzálódik, és a 6. órában hím előmagot képez. A fertilizációt követően 14 órával bekövetkezik a szingámia, és 14–24 órával a termékenyülés után megtörténik az első osztódás, amit szinkron-, később aszinkron osztódások követnek.

Sertésembriók esetében a négysejtes stádium meghatározó jelentőségű a további embrionális fejlődés szempontjából. Ekkor veszi át az embrionális genom az egyedfejlődés irányítását az anyai genomtól. Ebben az időszakban a sertésembriók fokozott érzékenységek a környezeti hatásokat tekintve, így a tápfolyadék és az inkubációs gázkeverék összetétele és minősége meghatározó jelentőségű.

4. táblázat: Sertésembriók *in vivo* és *in vitro* fejlődése NCSU-37 oldatban [Romar, 2006]

Fejlődési stádium	<i>In vivo</i> termékenyülés után eltelt idő (óra)	<i>In vitro</i> termékenyülés után eltelt idő (óra)
Zigóta	14	16–24
2–4 sejt	14–24	24–48
8 sejt	48	48–72
Morula	84	110–112
Blasztociszta	96–110	120–168
Expandálódott blasztociszta	148	168–192

A sertés *in vitro* előállított blasztociszták minősége elmarad az *in vivo* embriókétól; kevesebb sejtből állnak, továbbá fejlődésük is lassabb, mint *in vivo* körülmények között (Macháty et al., 1998; Kashiwazaki et al., 2001). Mindezek jelzik, hogy az IVC során alkalmazott médiumok szuboptimálisak az embriófejlődés szempontjából. Az eredmények javítása érdekében több kutatócsoport is próbálja fejleszteni az IVC-rendszert az alkalmazott oldatok kiegészítésével (pl. aminosavakkal, fehérjékkel, glükózzal), illetve kokultúrák (granulóza vagy petevezető epitel-sejtek) használatával (Ozawa et al., 2006; Katayama et al., 2007).

Sertésembriók tenyésztéséhez különböző tápoldatokat fejlesztettek ki: NCSU-23 és az NCSU-37 médiumok (Petters – Wells, 1993), Beltsville oldat (BECM-3, Dobrinsky et al., 1996a), Whitten's médium (Beckmann – Day, 1993) sertés zigóták részére kifejlesztett oldatok (PZM-3, PZM-4; Yoshioka et al., 2002). Az IVC rendszerben alkalmazott különböző oldatok embriófejlődésre gyakorolt eltérő hatásáról több kutatócsoport is beszámolt (Macháty et al., 1998; Kikuchi et al., 1999).

Az NCSU-23 oldat taurint és hipotaurint tartalmaz, melyeknek szerepük van a pH stabilizálásában és az ozmózis szabályozásában, továbbá védik a sejteket a káros oxidációs folyamatoktól (Guerin et al., 1995). Az IVC-oldatba adagolt taurin és hipotaurin embriófejlődésre gyakorolt pozitív hatásáról Petters és Wells (1993) számoltak be.

Az NCSU-37 szorbitolt tartalmaz, melynek embriófejlődésre gyakorolt hatása egérembriók esetében mutatkozott meg a legjobban: gyorsította az embriók kompaktálódási folyamatát, illetve segítette a blasztociszták expandálódását (Wells et al., 1992).

Úgy tűnik, hogy az eddig leginkább elterjedt NCSU-oldatok helyett a PZM médiumok kerülnek előtérbe (Okada et al., 2006), mert magasabb blasztociszta arány érhető el, illetve az embriók fejlődése is kiegyenlítettebb lehet és a blasztociszták kibújása is korábban történik, mint az NCSU-oldatok használatakor (Yoshioka et al., 2002; Agca et al., 2006). Yoshioka (2003) PZM oldatban tenyésztette a zigótákat 5 napon keresztül. Az általa alkalmazott PZM médium fehérje- és glükózmentes volt, ugyanakkor nátrium-piruvátot és nátrium-laktátot tartalmazott a petevezető fiziológiai szintjének megfelelő mennyiségben. Az embriótenyésztést követően 25 %-os blasztociszta arányról számolt be; a blasztomerek száma átlagosan 40 volt. A PZM oldatok embriófejlődésre gyakorolt pozitív hatása elsősorban aminosav-kiegészítésüknek köszönhető. Hörcsög embriókon végzett vizsgálatok kimutatták, hogy bizonyos aminosavak (pl. aszparagin, aszpartát, glicin, hisztidin, szerin és a taurin) jelenléte az IVC-oldatban stimulálja a zigóták fejlődését. Ezzel szemben egyes aminosavak, mint pl. a cisztein, izoleucin, fenilalanin, treonin és a valin ellenkezőleg hatnak; erősen gátolják a fejlődést (Bavister et al., 1990).

Rizos (2003) vizsgálatai szerint az IVC-oldatban jelen lévő szérum (BSA, FCS) gyorsítja az embriófejlődést. Több embrió fejlődött blasztocisztává az IVC hatodik napján a szérummal kiegészített oldatban kultivált embriók

esetében, mint a kontroll csoportban (Langendonck et al., 1997; Lonergan et al., 1999). Koo (1997) szerint is szükség van szérum-kiegészítésre az NCSU-oldatok esetében a korai morula állapot elérése után, különben blasztociszták kibújása késik, vagy elmarad.

AZ IVC-rendszerben nagyon fontos a fejlődő embriók energiaigényének kielégítése. Kikuchi (2002) mutatott rá az IVC-oldatok megfelelő glükóztartalmának fontosságára. Az IVC során alkalmazott oldatok piruvát- és laktát-kiegészítésének embriófejlődésre gyakorolt pozitív hatásáról szintén Kikuchi (2002) számolt be: vizsgálataiban az IVC első 2 napjában alkalmazott oldat nátrium-piruvátot és nátrium-laktátot, majd a fejlődés következő 4 napjában glükózt tartalmazott – ezzel a módosítással magasabb blasztociszta arányt (48,7 %) ért el, mint amikor az oldat csak glükózt tartalmazott (35,4 %).

Az embriófejlődés szempontjából az alkalmazott tápoldatokon kívül, fontos tényező még az embriótenyésztő gázkeverék összetétele is. Emlős embriók *in vitro* tenyésztése során az inkubátor légterének oxigéntartalma egyes, a tápközegben illetve az elhalt embrionális sejtekben levő szubsztrátokat oxidál, és így jelentős mennyiségű peroxid-gyök kerülhet a tápközegbe, mely az embrionális fejlődést gátolja (Pabon et al., 1989). A reaktív oxigén gyökök (ROS) keletkezésének egyik oka a nem megfelelő oxigén-koncentráció: a petevezető oxigéntartalma megközelítőleg $\frac{1}{4}$ -e a légköri levegő oxigéntartalmának (Mastroianni – Jones, 1965). A sejtek O_2 -tartalma $10 \mu\text{m/l}$, azonban a 37°C -os, légköri levegőn ekvilibrált oldat oxigéntartalma $224 \mu\text{m/l}$ (Jones et al., 1985). Kitagawa (2004) szerint az embriótenyésztés folyamán alkalmazott, 5 %-ra csökkentett oxigéntartalom növeli az embriók fejlődési erélyét, Karja (2004) szerint a blasztociszták sejttségét is.

Az IVC hatékonyságán kokultúrák alkalmazásával is lehet javítani. Több kutatócsoport számolt be sertés petevezetőből származó epitel sejtekkel való együtt kultiválás embriófejlődésre gyakorolt pozitív hatásáról (White et al., 1989; Nagai – Moor, 1990; Romar et al., 2005).

2.2. Partenogenetikus aktiválás

A petesejtek partenogenetikus aktiválásával kapcsolatos kutatások közel harminc évvel ezelőtt kezdődtek. Ezeknek a kísérleteknek a célja azonos ploidijú, homogén embriók előállítása volt, ugyanis az IVP-embriók (részben a polispermia nagyfokú előfordulása miatt) nagy szórást mutatnak a ploidia és a fejlődési potenciál szempontjából.

A petesejtek aktiválásával kapcsolatos vizsgálatok elsősorban a klónozásos technikák terjedésével kerültek a figyelem középpontjába: sejtmag-átültetéses klónozás során nagyon fontos lépés a donor petesejtek aktiválása, mely biztosítja a sejtciklus folytatását. A módszer alkalmas sejttani kutatásokra is, hiszen a keletkező embriókban az anyai

kromoszómák az apaitól függetlenül vizsgálhatók. Továbbá lehetőség van – az IVP technikákhoz hasonlóan – a termékenyülés, és a korai embrionális fejlődés vizsgálatára is (Lee et al., 2004).

2.2.1. Petesejtek aktiválásának alapjai

In vivo körülmények között a petesejtbe jutó spermium az oocita aktiválódását és a meiózis folytatását eredményezi; ez a folyamat többlépcsős, bonyolult mechanizmus. A partenogenezis során a keletkező embriók azonban kizárólag a petesejtből származnak – keletkezésükben a hímivarsejtek nem vesznek részt (Pather et al., 1999).

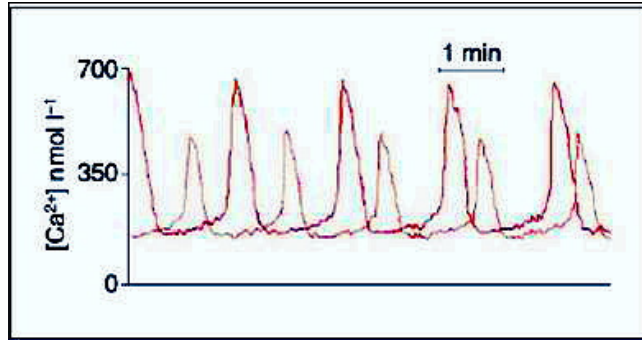
Az emlős petesejtek – a kutya kivételével – ovulációkor M-II állapotban vannak, és maradnak egészen a termékenyülésig; a meiotikus osztódást csak a fertilizációt követően fejezik be (Ben-Yosef – Shalgi, 1998; Alberio et al., 2001). A meiózis folyamatát a metafázist elősegítő faktor (MPF) aktivitásának meghatározott változásai irányítják, és szintén az MPF nevű fehérje aktivitása felelős az oociták M-II állapotban tartásáért is (Nurse, 1990). Az MPF két alegységből álló molekula, a cdc2 (ciklin-dependens kináz alegység) és a ciklin B (regulátor alegység) heterodimerje. Az MPF a Ca^{2+} -érzékeny citosztatikus faktor (CSF) szabályozása alatt áll. A CSF-t a M-II állapotú oocita folyamatosan szintetizálja (O'Keefe et al., 1989); a CSF legalább három fehérjéből épül fel: MOS (Sagata, et al., 1998), MAPK (Haccard et al., 1993), és a p90^{Rsk} (Gross et al., 1999). Ezek a fehérjék felelősek a kromoszómák kondenzált állapotban tartásáért, illetve ezáltal a DNS-replikáció megakadályozásáért (Verlhac et al., 1994).

In vivo, a spermium penetrálódása a petesejtbe szignál transzdukciós folyamatot indít el, minek hatására az oocita felszabadul a meiotikus gátlásból, és folytatja az osztódást. A mesterséges aktiválás a termékenyítő spermium által előidézett folyamatok szimulálásával valósítható meg.

Az aktiválódási folyamat nem teljesen ismert; több, bonyolult szignál transzdukciós mechanizmusból áll, azonban nyilvánvaló, hogy a kalciumnak, az MPF-nek és egyéb stabilizáló molekuláknak (pl. CSF-fehérjék) a szerepe meghatározó.

Természetes körülmények esetén a spermium elsőként a petesejt zona pellucidájával (ZP) találkozik. A ZP három glikoproteidből épül fel: ZP1, ZP2, ZP3. A spermium plazmamembránjának egyik molekulája kapcsolódik a ZP3 szénhidrátlancaihoz, majd a kapcsolódás következtében a hímivarsejt citoplazmájában megnő az intracelluláris Ca^{2+} -koncentráció. A megnövekedett Ca^{2+} -koncentráció okozza az akroszóma exocitózisát. Felszabadulnak a penetrációhoz szükséges enzimek, majd a spermium a perivitellinárius térbe jut, és kapcsolódik a petesejt plazmamembránjához (Schultz – Kopf, 1995). Ez a kapcsolódás a petesejt citoplazmájában a szabad Ca^{2+} -szintjének növekedését okozza, ami az aktiválódás kísérő jelensége (Lawrence et al., 1997). Nem egyszeri Ca^{2+} -szint emelkedésről,

hanem a spermium penetrációjának helyéről meginduló, hullámszerű terjedésről van szó (Jaffe, 1983; Whitaker – Swann, 1993). Sertés esetében a Ca^{2+} -szintjének változásai a citoplazmában egyszerre történnek (Macháty et al., 1997). A kalcium-oszcilláció jelenségét több fajban is megfigyelték: egér (Cuthbertson – Cobbold, 1985), hörcsög (Miyazaki, 1986), sertés (Sun et al., 1992), szarvasmarha (Fissore et al., 1992), patkány (Ben-Yosef et al., 1993), nyúl (Fissore – Robl, 1993), ember (Taylor et al., 1993).

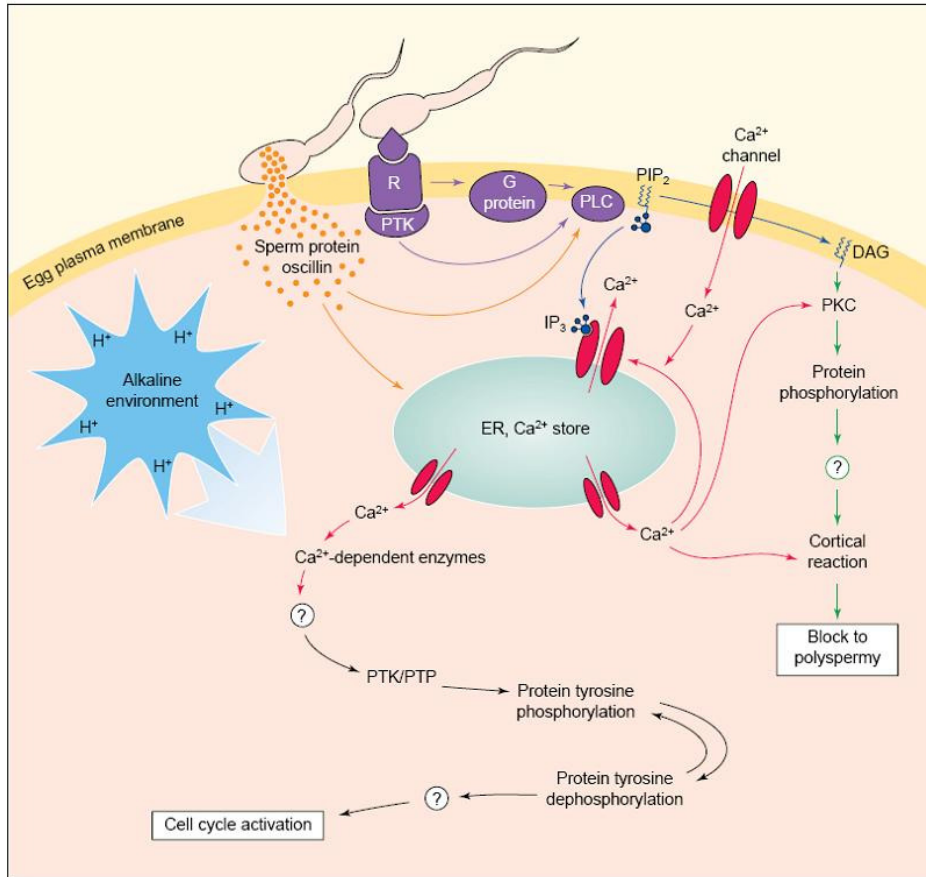


5. kép: Ca^{2+} -oszcilláció *in vitro* termékenyített emberi petesejtben
[Ben-Yosef – Shalgi, 1998]

A termékenyítést követően megemelkedett Ca^{2+} -szint hatására az oocita felszabadul a CSF által aktivált MPF gátlása alól (az MPF inaktiválódik), és folytatódik a meiózis: a metafázis-II-ből az anafázis-II stádiumba való átmenet (Nixon et al., 2002).

A petesejt aktiválódása azonban egyéb folyamatokat is magában foglal. A felhalmozódott Ca^{2+} -ionok hatására megtörténik a kortikális granulomok exocitózisa (kortikális-reakció), mely során a felszabaduló enzimek módosítják a ZP összetételét (zona-reakció), ezáltal védelmet biztosítva a polispermiás termékenyüléssel szemben (Ducibella, 1991).

Az aktiválódást követően kilökődik a második sarkitest, kialakulnak a pronukleuszok, megtörténik a szingámia, a DNS replikálódása, majd az első mitotikus osztódás (Xu et al., 1994).



6. kép: Spermium által indukált petesejt-aktiválódás folyamata. A spermium kapcsolódik a G-protein receptorához, vagy a tirozin foszforilált receptorhoz (PTK). A kapcsolódás az intracelluláris Ca²⁺-szint megemelkedését okozza. A Ca²⁺-szint emelkedése hat a spermiumban lévő oszillin nevű fehérjére is. A megnövekedett Ca²⁺-mennyiség az endoplazmatikus retikulumból (ER) származik. A Ca²⁺-oszcilláció a meiózis folytatását, a sejtciklus aktiválását, a kortikális granulumok excitóízisát okozza, ami a polispermia elleni védekező mechanizmus része. A Ca²⁺-szint megemelkedése aktiválja a Ca-függő enzimeket, melyek segítik a receptorfehérje nélküli tirozin-kináz (PTK) enzimet, vagy inaktíválják a tirozin foszfatáz fehérjét (PTPs). [Ben-Yosef – Shalgi, 1998]

2.2.2. Petesejtek mesterséges aktiválásának módjai

Az 1990-es években alacsony blasztociszta arányról, lassú embrionális fejlődésről számoltak be mesterségesen aktivált petesejtek esetében. A partenogenetikus embriók blasztomereinek száma is kevesebb volt, mint az

IVF-embrióké. Zhu és csoportja (2002) volt az első, aki elektromos aktiválást követően 50 % feletti blasztociszta arányt ért el. Az elektromos és a kémiai aktiválási módokat kombinálva, hasonlóan nagyszámú hólyagcsíra embriókról számolt be Lee (2004) is. Vizsgálatai során nemcsak nagyobb arányú, hanem gyorsabb embriófejlődést is tapasztalt, mint a korábbi közleményekben leírtak. Lee már az aktiválást követő ötödik napon expandálódott blasztocisztákat figyelt meg.

A mesterséges aktiválás célja a természetes körülmények közötti, spermium által kiváltott folyamatok modellezése, vagyis az intracelluláris Ca^{2+} -szint emelése, illetve az MPF-aktivitás csökkentése.

MPF-aktivitás csökkentése

Az MPF felelős a petesejtek M-II állapotban tartásáért; szintjének csökkenése a meiózis folytatását eredményezi. Az MPF inaktiválódása szükséges a második sarkitást kilökődéséhez, a kromoszómák dekonzenzációjához és a pronukleuszok kialakulásához is (Swann – Ozil, 1994). Az MPF-szint a ciklin B szintézisének és degradálódásának függvénye (Kubiak et al., 1993). Ez az alapja annak, hogy a fehérjeszintézis-gátlók használatával indukálható a petesejtek aktiválódása. Az MPF-aktivitás gátlásának egyik lehetséges módja tehát a petesejtek inkubálása széles spektrumú fehérjeszintézis és/vagy fehérje-foszforilációt gátló vegyületeket tartalmazó oldatban (Macháty – Prather, 1998).

Egér (Moses – Kline, 1995) és humán (Balakier – Casper, 1993) petesejtek esetében sikeresen alkalmaztak két fehérjeszintézis-gátló vegyületet, a cikloheximidet (CX) és a puomicint. A CX általános fehérjeszintézis-gátló, ami nemcsak specifikusan az MPF szintézisét gátolja, hanem a ciklin B szintézisét is. A ciklin B az MPF szabályozó alegysége, ami a sejtosztódás kezdetekor lebomlik (Nurse, 1990). A CX azonban sertés petesejtek esetében egyes kutatók szerint önmagában nem képes kiváltani az aktiválódást (Nussbaum – Prather, 1995). Yi és Park (2005) sikeres aktivációról számoltak be cikloheximid alkalmazásakor, de kísérleteikben a CX-kezelést a petesejtek 8 % etanol tartalmú NCSU-23 oldatban történő 10 perces inkubálása előzte meg.

Ismert, hogy a 6-dimetil-aminopurin (6-DMAP), protein szerin/treonin kináz inhibitor vegyület hatására a meiotikus orsó lebomlik, és a petesejt interfázisba jut (Schlegel et al., 1990; Navara et al., 1994). A 6-DMAP specifikusan az MPF-re ható fehérjeszintézis gátló – az MPF heterodimer másik alegységét, a cdc2 proteinkináz alegységét blokkolja. Moses (1995) és Takahashi (1996) vizsgálatai szerint a 6-DMAP gyorsította a pronukleusz kialakulását és a partenogenetikus embriók fejlődését egér és szarvasmarha petesejtek esetében.

A 6-DMAP-hoz hasonló, specifikus protein-foszforilációt blokkoló vegyület a butirolakton-I. Dinnyés (2000) és Bing (2003) vizsgálataiban az elektromos

kezelés és a butirolakton-I kombinációja alkalmas volt sertés petesejtek aktiválására.

Intracelluláris Ca^{2+} -szint emelése

A sejten belüli Ca^{2+} -koncentráció emelése lehetséges az intracelluláris Ca^{2+} raktárak (pl. az endoplazmatikus retikulum) stimulálásával, illetve az alkalmazott tápoldatokból Ca^{2+} -ionok sejtbe áramlásával; de ehhez a petesejt plazmamembránját a Ca^{2+} -ionok számára átjárhatóvá kell tenni.

Lehetőség van továbbá a Ca^{2+} -ionok direkt citoplazmába injektálására is. Macháty (1996) 25–1000 μM $CaCl_2$ citoplazmába injektálásával a cdc2 kináz aktivitásának csökkenését, pronukleusz-képződést és embrionális fejlődést indukált. Okada (2003) stroncium-, bárium- és kalcium-ionokat injektált sertés (M-II) petesejtek citoplazmájába. 168 órás inkubálást követően a petesejtek 29 %-a (Sr^{2+}), 29 %-a (Ba^{2+}) és 51 %-a (Ca^{2+}) fejlődött blasztocisztává.

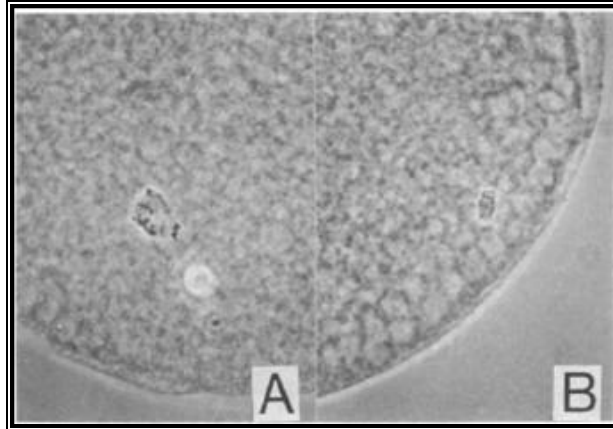
A plazmamembrán Ca^{2+} -ionok számára átjárhatóvá tétele történhet elektromos impulzussal (Collas et al., 1989; Zhu et al., 2002). A nagy feszültségű (0,05 kV/cm – Lee et al., 2004; 4 V/mm és 120 V/mm – Nánássy et al., 2007b), rövid ideig tartó (10 s – Lee et al., 2004; 60 μs – Nánássy et al., 2007b) egyenárammal a plazmamembrán reverzibilisen destabilizálódik. Következtében a kettős foszfolipid rétegen pórusok nyílnak meg, amelyeken keresztül Ca^{2+} -ionok áramlanak be az extracelluláris térből az ooplazmába (Lee et al., 2004).

Az etanolt sikeresen alkalmazták egér (Cuthbertson et al., 1981), szarvasmarha (Nagai, 1992) és sertés (Didion et al., 1990a) petesejtek aktiválására. Yi és Park (2001) különböző koncentrációjú (5–10 %) etanolt tartalmazó oldatban 10 percig inkubálták a petesejteket. A legnagyobb arányú (34,9 %) aktiválódást a 8 % etanolt tartalmazó oldat esetében jegyezték fel.

Az etanol egyszeri intracelluláris Ca^{2+} -szint emelkedést okoz, ami Sun (1992) szerint elegendő a kortikális granulomok exocitózisának kiváltásához. Lee (2004) vizsgálatai alátámasztják ezt az állítást, miszerint sertés petesejtek mesterséges aktiválásához és a blasztociszta stádium eléréséhez nincs szükség kalcium-oszcillációra. Ugyanakkor több kutatócsoport nem ért egyet ezzel a hipotézissel. Ducibella (2002, 2006) szerint egyszeri Ca^{2+} -felszabadulás nem képes előidézni az MPF inaktiválódását. Jones (1995) szerint a CSF ismételt Ca^{2+} -jelek hiányában újraszintetizálódik, és ezáltal az MPF aktivitása is visszaáll. Az MPF újraaktiválódása fehérjeszintézis és/vagy protein-kináz gátlók használatával elkerülhető.

Az ooplazma Ca^{2+} -tartalma növelhető a petesejtek inkubálásával is ionoforokat és ionomicint tartalmazó oldatban (Tesarik – Sousa, 1995). A Ca^{2+} -

H^+ -, Mg^{2+} -ionofor A23187 stimulálja a kortikális granulumok kiürülését és az előmag-képződést (Wang et al., 1999). Az ionomicin-kezelés a petesejtek intracellulris Ca^{2+} -raktárainak kiürülését okozza (Alberio et al., 2001; Che et al., 2007).



7. kép: Kalcium-ionoforral aktivált petesejtek: normális (A), abnormalis (B) orsóval. [Funahashi et al., 1994b]

A stroncium-klorid emlős petesejtek aktiválásához széles körben alkalmazott vegyület (Otaegui et al., 1999; Meo et al., 2004, Tomashov-Matar et al., 2005). Megfigyelték, hogy egér petesejtekben a stroncium Ca^{2+} -oszillációt okoz, de a stroncium által kiváltott Ca^{2+} -szint-emelkedések alacsonyabb rezgésszámúak, mint amiket termékenyüléskor figyeltek meg (Kline – Kline, 1992). A stroncium petesejtbe juttatásával kiválthatók a penetrálódott spermium által előidézett folyamatok (Zhang et al., 2005). A stroncium a sejten belüli ioncsatornákat a Ca^{2+} számára átjárhatóvá teszi, és segíti az ER-ből a Ca^{2+} -ionok felszabadulását. Egér petesejtek esetében a legnagyobb aktiválódási arányt akkor érték el, amikor a petesejteket 10 mM koncentrációjú stroncium-kloridot tartalmazó oldatban inkubálták 2,5–3 órán keresztül (Ma et al., 2005; Loren – Lacham, 2006).

Az aktiválódási rátával és az azt követő partenogenetikus embriófejlődéssel kapcsolatban, a legjobb eredmények általában a különböző aktiválási módok (elektromos és kémiai) kombinációjával érhetők el (Roh – Wang, 2002; Bing et al., 2003; Kragh et al., 2005; Yi – Park, 2005).

2.3. Génmegőrzés – Gaméták vitrifikációs hűtése

2.3.1. A mangalica sertés

A mangalica, ősi magyar zsírsertés az 1800-as években jelent meg. Kialakulásában a magyar parlagi fajtának és a délvidéki sumadia sertésnek volt nagy szerepe. Több színváltozatban tenyésztették: fekete, fecskehasú, vörös vagy rőt, szőke és ordas. Napjainkban csak a fecskehasú, a vörös és a szőke mangalicák tenyésztése folyik. A legújabb DNS–mikroszatellit vizsgálatok bebizonyították, hogy a színváltozatok önálló fajták, illetve megállapították, hogy egymáshoz a szőke és a fecskehasú mangalica áll a legközelebb (Zsolnai et al., 2006).

A XIX. században nagy népszerűségnek örvendett ez a zsírsertés típus, azonban a második világháborút követően kiszorult a köztenyésztésből és elvesztette gazdasági jelentőségét. Kicsi szaporasága, alacsony évenkénti felnevelt malacsám/koca arány, túlzott zsírosodása és a fogyasztói igények megváltozása miatt bekövetkező fajtaváltás következtében számuk lecsökkent (Szabó, 2006a).

A fajta megmentése érdekében 1976-tól állami támogatás segíti a génrezervátumokban a tenyésztői munkát.

1994-ben alakult meg Debrecenben a Mangalicatenyésztők Országos Egyesülete, amely az Országos Mezőgazdasági Minősítő Intézettel együtt elkészítette a három mangalica sertésfajta törzskönyvét.

Az Állattenyésztési és Takarmányozási Kutatóintézetben a mangalica szaporaságának javítása céljából folynak kutatások (Egerszegi et al., 2003; Rátky et al., 2006)

Táplálkozásbiológiai szempontból a mangalica húsa nagyobb zsírtartalmú, mint a hússertéseké – az átlagos izomközi zsír 7,5 %, ami lapály esetében mindössze 1,1 %. A nagyobb zsírtartalom – ami táplálkozás–élettani szempontból nem előnyös – azonban finom eloszlással párosul, ezáltal a mangalica húsa alkalmas steak–jellegű húsok, szalámifélék és érlelt sonka készítésére (Zelenák et al., 2006).

Több kutatócsoport vizsgálta a mangalica zsírjának zsírsavösszetételét, a kapott eredmények azonban nem egyértelműek. Szabó (2006b) szerint a mangalica zsír 12–16 %-kal kevesebb telített és 8–10 %-kal több telítetlen zsírsavat tartalmaz, mint a modern sertésfajták. Csapó (1999) vizsgálatai szerint a mangalica zsírjának zsírsavösszetétele gyakorlati szempontból teljesen azonos értékű a magyar nagy fehér × magyar lapály és a mangalica × duroc sertések zsírjával. Szerinte nincs alapja azoknak a feltételezéseknek, melyek szerint a mangalica zsírja kedvezőbb zsírsavösszetételénél fogva könnyebben emészthető és egészségesebb, mint a modern fajtáké.

A mangalicatartás előnyei a következőkben foglalhatók össze: tartási-, takarmányozási költségei alacsonyabbak, mint az intenzív fajtáké; tartása

harmonizál az Európai Unió környezetvédelmi, állatvédelmi előírásaival; a mangalica alkalmas mocsarak rekultiválására, a termelésből kivont területek hasznosítására; ökotermékek előállítására; Serrano-típusú sonka készíthető a húsból; továbbá tenyésztése a falusi turizmust is szolgálhatja. (Szabó, 2006a).

A mangalicatenyésztés egyik legfontosabb célja azonban a fajta megmentése, megőrzése, ezzel hozzájárulva a természeti környezet sokszínűségéhez.



8. kép: Szőke mangalica koca malacaival [Saját felvétel]

2.3.2. Gaméták, embriók krioprezervációja

Gaméták és embriók krioprezervációjával kapcsolatban a kutatások az 1970-es években kezdődtek meg. Napjainkban a különféle fagyasztási technikákat széles körben alkalmazzák szarvasmarha, kecske, juh, sertés és egyéb modellállatok gamétáinak és embrióinak megőrzésére (Niemann, 1991). A krioprezerváció lehetővé teszi az örökítőanyag megőrzését, annak globális szállítását, továbbá segítségével mód nyílhat tenyészvonalak újratehermentésére vagy szaporítására, és az eljárással a szelekciós nyomás is növelhető (Dobrinsky, 2002).

A sikeres krioprezerváció több tényező függvénye: a gaméták, embriók fejlettségi állapota, krioprotektív anyagok alkalmazása, a fagyasztás és tárolás módja, hűtési sebesség, felolvasztás módja, krioprotektív anyagok eltávolítása (Liebermann et al., 2003).

Embriók és gaméták krioprezervációja történhet hagyományos, lassú hűtéssel, illetve vitrifikációs technikákkal. Mindkét eljárás alapja az, hogy alkalmazásuk során a sejtek elveszítik az intracelluláris víztartalmuk nagy részét.

5. táblázat: A vitrifikáció és a hagyományos hűtési eljárás összehasonlítása [Forrás: Moore – Bonilla, 2006]

	Vitrifikáció	Hagyományos hűtés
Direkt kontaktus a folyékony nitrogénnel	Igen	Nem
Jégkristály-képződés	Nincs	Van
Krioprotektív anyagok koncentrációja	Magas (40–60 %)	Alacsony (8–10 %)
Hűtési sebesség	15.000 – 30.000 °C/perc	0,3 – 0,6 °C/perc
Költségek	Olcsó	Drága
Direkt embriótranszfer	Lehetséges	Lehetséges

Hagyományos hűtési eljárás

A hagyományos, lassú hűtési eljárást elsőként egérembríókon alkalmazták sikerrel 1972-ben (Whittingham et al., 1972), majd 1973-ban, 10–13 napos fagyasztott embrióból megszületett az első borjú (Wilmot – Rowson, 1973). 1983-ban humán embriót is sikerült lassú hűtéssel fagyasztani, visszaolvasztani, beültetni, melyből egészséges csecsemő született (Trounson – Mohr, 1983).

Napjainkban a hagyományos hűtési eljárásokat rutinszerűen alkalmazzák, azonban a kapott eredmények – pl. a visszaolvasztást/beültetést követő vemhesülési százalék – nagy szórást mutatnak. Rall (1992) szarvasmarha esetében 14 %-os, míg Van Wagendonk (1997) 45 %-os vemhesülési arányról számolt be.

Hagyományos hűtési eljárásokkal az alkalmazott krioprotektív anyagok alacsony (1–2 M) koncentrációja miatt a toxicitás is minimálisra csökkenthető (Campos-Chillon et al., 2006). A hagyományos hűtési eljárások lehetővé teszik az intracelluláris és az extracelluláris folyadékterek közti ionáramlást, így az ozmotikus stressz csökkentését is (Vajta – Kuwayama, 2006).

A lassú hűtési eljárás esetén a dehidráció több lépcsőben, végső töménységben, a sejtek 10–11 % permeabilis krioprotektív anyagot tartalmazó oldatban történő inkubálásával oldható meg. A hőmérséklet fokozatos csökkentését követően kiváltják a jégkristályképződést („seeding”), amit szabályozott ütemű, lassú hűtés követ (Visintin et al., 2002).

Embriók hagyományos hűtésére a leggyakrabban alkalmazott eljárás a következő: az embriókat 5–10 percig 1–2 M koncentrációjú krioprotektív anyagokat tartalmazó oldatban, 20–25 °C-on ekvilibráltatják; –5 és –9 °C között (az alkalmazott hűtőközeg izoelektromos pontjától függően) jégkristályképződést váltanak ki. Ezt követően 0,3–0,6 °C/perc hűtési sebességgel –33 és –40 °C közötti hőmérsékletre hűtik, végül folyékony nitrogént (LN₂) tartalmazó (–196 °C) tartályokba helyezik az embriókat (Fair et al., 2001; Nedambale et al., 2004).

Vitrifikáció

A vitrifikációs eljárást eleinte egyes szervek fagyasztására használták (Fahy et al., 1984). Egémbriókon elsőként 1985-ben Rall és Fahy alkalmazta sikeresen, majd ezt követően a módszert patkány, nyúl, juh és szarvasmarha embriókon is kipróbálták az 1980-as években (Massip et al., 1986; Smorag et al., 1989). Az első sikeres sertésembrió vitrifikációról Yoshino számolt be 1993-ban.

Új módszer, mellyel kiküszöbölhető az intracelluláris és az extracelluláris jégkristály-képződés. A vitrifikáció üvegesedést jelent – utalva az üvegszerű állapotra, melyben a sejtek megszilárdulnak az eljárás során. A vitrifikáció az oldat viszkozitásának nagymértékű növelését igényli, ami a krioprotektív anyagok koncentrációjának emelésével érhető el. A vitrifikációs eljárás kritikus pontja azonban a krioprotektív anyagok magas koncentrációja, ami ozmotikus és toxikus ártalmakat jelenthet az embriók számára. Másrészt a gyors hűtési sebesség lehetővé teszi a sejtek/embriók kritikus hőmérsékleti zónán (+15 °C és –5 °C között) való gyors áthaladását, ezzel csökkentve a fagyasztás során fellépő károsodásokat (Rall, 1987; Weber et al., 1992). A fagyasztást követő visszaolvasztás technikája alapvetően nem különbözik a hagyományos hűtést követő visszaolvasztás módjától: a krioprotektív anyagok kivonására általában szaharóz (sucrose)–oldatot használnak.

A sertés gaméták és embriók rendkívül érzékenyen reagálnak a hűtésre (Polge et al., 1974; Didion et al., 1990b). Ez az érzékenység korlátozza az alkalmazható hűtési technikákat; esetükben a hagyományos hűtési eljárások alacsony hatásfokkal bírnak; a megoldást a vitrifikáció alkalmazása jelentheti (Dobrinsky, 1997).

Az elmúlt évtizedben több vitrifikációs módszert dolgoztak ki, melyek sikerrel alkalmazhatók sertés embriók (Yoshino et al., 1993; Kuwayama et al., 1997; Esaki et al., 2004) és petesejtek (Didion et al., 1990b; Isachenko et al., 1994; Fujihara et al., 2004a) fagyasztására.

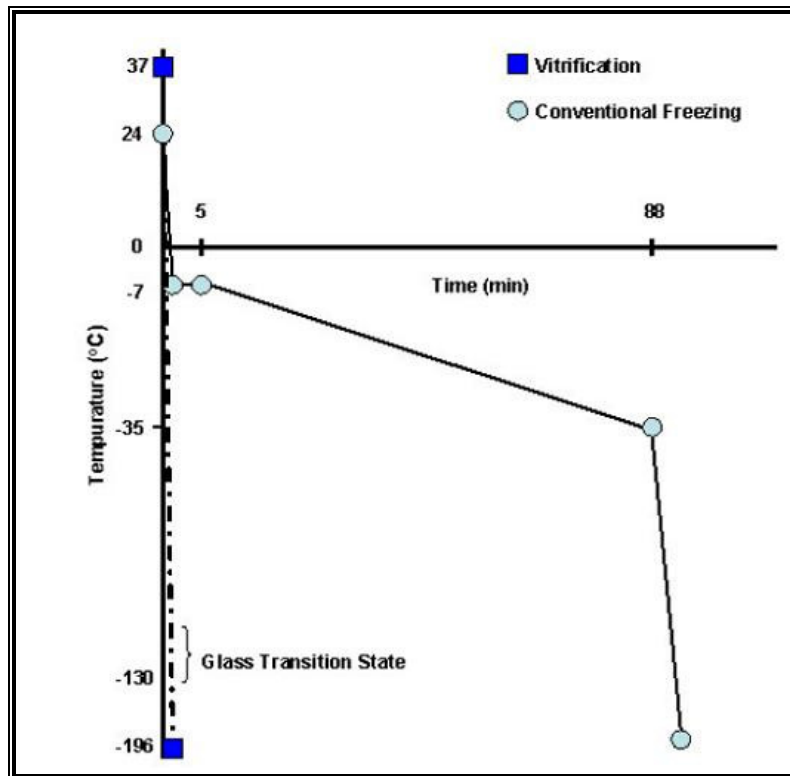
A klasszikus vitrifikációs eljárásnál hagyományos műszalmákban történik az embriók fagyasztása, ami megközelítőleg 2500 °C/perc hűtési sebességet eredményez (Rall – Fahy, 1985).

A hűtési sebesség több tényező függvénye: oldatmennyiség a petesejt/embrió körül, a hordozó átmérője, falának vastagsága, direkt kontaktus a folyékony nitrogén (LN₂) és a gamétákat/embriókat tartalmazó oldat között.

A „nyitott végű műszalma” (OPS) vitrifikációs eljárás ezeknek a paramétereknek a redukálását teszi lehetővé. A technikát 1997-ben Vajta mutatta be – az első megszületett malacról, mely OPS eljárással fagyasztott blasztociszta embrióból származott, Berthelot számolt be (2000). Az OPS vitrifikáció esetében a hordozó egy nyitott végű műanyag- vagy üvegkapilláris, melynek térfogata 0,25 ml, átmérője pedig a hagyományos műszalmának a fele. Az üveg jó hővezető képessége miatt gyorsabb hűtési és felmelegedési sebességet tesz lehetővé (akár 20.000 °C/perc is lehet). A petesejteket/embriókat 1–2 µl oldatban, kapilláris-elven szívják fel a speciálisan kialakított műszalmákba, majd közvetlen LN₂-be mártják. Az ekvilibráció/hűtés és a visszaolvasztás/dehidráció 7 illetve 15 percet vesz igénybe (Vajta et al., 1997).

Az MVC (minimális térfogatban történő hűtés) technikát Hamawaki (1999) szarvasmarha embriókra dolgozta ki. Az eljárás lényege, hogy speciálisan kiképzett, megközelítőleg 1 mm széles műanyag lemezre helyezik 5 µl-es cseppben a sejteket, háromlépcsős ekvilibrációt követően. A lemezt azután LN₂-ben hűtik, majd az erre a célra kialakított műanyag hengerbe helyezik. A kis térfogat és a közvetlen érintkezés a LN₂-el, rendkívül gyors hűtést tesz lehetővé. Hamawaki 75,8 %-os embrió túlélést tapasztalt a visszaolvasztást követően.

Az SSV (Solid surface) eljárás esetében a sejteket 1–2 µl-es cseppben, előhűtött (–150 °C) fém felületen fagyasztják (Dinnyés et al., 2001, Somfai et al., 2006).



9. kép: Hagyományos hűtés és a vitrifikáció hűtési sebességének összehasonlítása [Moore – Bonilla, 2006]

2.3.3. A vitrifikáció során alkalmazott oldatok

A vitrifikáció során alkalmazott oldatok közös tulajdonsága, hogy nagy a viszkozitásuk, ami a magas koncentrációban alkalmazott krioprotektív anyagoknak köszönhető. A médiumok tartalmazhatnak még cukrokat, fehérjéket és egyéb makromolekulákat.

Krioprotektív anyagok (CPA-k)

Védőanyagok. Az oldat fagyáspontját csökkentik, és eddig ismeretlen módon stabilizálják a sejtmembránt. Alacsony hőmérsékleten növelik az oldat viszkozitását, amivel elkerülhető a fagyasztás során a jégkristályok képződése. Vitrifikációt segítő hatásuk azzal függ össze, hogy képesek a vízmolekulákhoz kötődni, illetve a sejten belül helyettesíteni a vizet. A CPA-k azonban magasabb hőmérsékleten toxikusak, de ez a tulajdonságuk

kiküszöbölhető alacsony hőmérsékleten és rövid ideig tartó, többlépcsős ekvibrálással (Agca et al., 1998). Első lépcsőben alacsonyabb koncentrációjú CPA-kat tartalmazó oldatban, majd végleges koncentrációjú CPA-kat tartalmazó médiumban történik az ekvibrálás, ezt követően kerülnek a műszalmák a LN₂-be. Valdez (1992) egérembriókat vitrifikált az egylépcsős és a kétlépcsős technikával – tapasztalatai szerint nem volt lényeges különbség a blasztociszta–arány tekintetében (45 illetve 54 %), azonban több megszületett utódot jegyzett fel a kétlépcsős ekvibrálást követően.

- Permeábilis (intracelluláris) krioprotektív anyagok

Az intracelluláris folyadék dehidráálásához a permeábilis CPA-k nélkülözhetetlenek. Ezek az anyagok passzív úton, a víz kiáramlásánál lassabban jutnak be a sejtbe; emiatt elsőként a sejtek zsugorodnak a CPA-k beáramlása után, végül elnyerik megfelelő alakjukat.

A permeábilis CPA-k sejthártyán való áthaladása függ a CPA permeabilitási együtthatójától, hőmérséklettől, molekulatömegtől, a petesejt/embrió felületének nagyságától.

Az intracelluláris CPA-k közé tartoznak a következők (kevésbé toxikustól a legmérgezőbb felé haladva): etilén-glikol (EG), propándiol, glicerin, dimetil-szulfoxid (DMSO), acetamid.

Az EG-t sikeresen alkalmazták petesejtek és embriók fagyasztásakor (Dobrinsky – Johnson, 1993). Az EG az egyik legpermeábilisabb CPA (Széll et al., 1989). Ez a tulajdonsága rövidebb ekvibrációt és gyorsabb visszaolvasztást tesz lehetővé a fagyasztás előtt (Kasai – Mukaida, 2004).

A permeabilitás azonban függ a petesejtek és az embriók fejlettségi állapotától is: a kibújt blasztociszta könnyebben bejutnak a permeábilis CPA-k, mint a zona pellucidával rendelkező petesejtbe/embrióba. Pedro (2005) mutatott rá, hogy a csírahólyag (GV)-stádiumú sertés petesejtek kevésbé permeábilisak az EG-lal szemben – ez lehet a magyarázata annak, hogy ezek a petesejtek a hűtésre rosszabbul reagálnak, mint az M-II állapotú oociták.

- Nem permeábilis (extracelluláris) krioprotektív anyagok

Nagyobb molekulák, mint a permeábilis CPA-k, ezért a sejt passzív diffúzióval nem képes felvenni ezeket az anyagokat. Ide tartoznak a cukrok (pl. szaharóz, trehalóz) és bizonyos makromolekulák (pl. Ficoll).

Cukrok

A cukrok, mint a monoszaharidok (pl. glükóz, fruktóz, szorbitol, mannitol), diszaharidok (pl. szaharóz, trehalóz), poliszaharidok (pl. raffinóz, dextrán) részt vesznek a sejtek dehidráálásában: növelik az ozmolalitást, miközben segítenek megőrizni a sejt struktúráját.

A fagyasztás előtti ekvilibrálás különböző cukrokat tartalmazó oldatban, lehetővé teszi a gyors vízkiáramlást a sejtből – ezáltal csökkenthető az ekvilibráció ideje.

A cukrok ozmotikus egyensúlyt is fenntartanak: oldathoz adagolásukkal csökkenthetők a visszaolvasztáskor fellépő ozmotikus ártalmak (Liebermann et al., 2003).

Tapasztalatok szerint a monoszaharidok jobban alkalmazhatók a vitrifikációs oldatokban, mint a di- és poliszaharidok. Utóbbiakkal az a gond, hogy felolvasztáskor és szobahőmérsékleten kicsapódhatnak az oldatból, és az embriókra nézve toxikusabbak, mint a monoszaharidok (Kuleshova et al., 1999).

Fehérjék

Ismert, hogy a szérumnak (FCS, BSA) membránvédő hatása van, azonban a vitrifikációs oldatok szérum–kiegészítésével kapcsolatos kutatási eredmények nem egységesek.

Men (2005) szerint az ekvilibrációhoz használt oldatok kiegészítése szérummal előnyösen hatott az embriók túlélésére és az embriófejlődésre a visszaolvasztást követően.

Vajta (1999) szintén a szérum–kiegészítés (20 % FCS vagy 20 % BSA) pozitív hatásáról számolt be szarvasmarha blasztociszta embriók OPS vitrifikációjakor.

Ezzel szemben Mucci (2006) vizsgálatai szerint (szintén szarvasmarha embriók esetében) a szérum–kiegészítés nélküli csoportban az embriók jobb túlélési arányt mutattak.

Abe (2002) a szérum negatív hatását azzal magyarázta, hogy a szérum–kiegészítést tartalmazó oldatban ekvilibrált szarvasmarha embriók lipidcseppjeinek száma és mérete megnőtt, ami közismerten kedvezőtlen hatású a vitrifikáció sikerességére nézve.

Egyéb makromolekulák

A különböző makromolekulák a fagyasztás során növelik a viszkozitást, és segítik az extracelluláris jégkristály–képződés elkerülését.

A nem permeábilis makromolekulák kevésbé toxikusak, mint a CPA-k (Liebermann et al., 2003).

A vitrifikációs oldatokban leggyakrabban alkalmazott makromolekulák a következők: polietilén-glikol 8000, polivinil-pirrolidon 360.000, Ficoll 70.000

vagy 400.000, polivinil-alkohol, dextran. Ezek a vegyületek védik a zona pellucidát és segítik az embriók fejlődését (Doumoulin et al., 1994).

Növekedési faktorok

Desai (2000) vizsgálatai szerint az EGF-t, az IGF-1-t és az IGF-2-t tartalmazó oldatokban történő ekvibrálatás javítja a sejtek túlélését a visszaolvasztást követően.

2.3.4. Visszaolvasztás

A vitrifikációs eljárás sikerességét a fagyasztáshoz hasonlóan, a visszaolvasztás módja is befolyásolja.

A műszalmák visszaolvasztása történhet 10 másodpercig szobahőmérsékleten tartással, majd fél percre 35 °C-os vízfürdőbe helyezéssel (Fair et al., 2001). Az OPS eljárás esetében a műszalmák visszaolvasztása néhány másodpercig történő kézben-tartással, majd ekvibrációs oldatba (37 °C) mártással történik. Ebben az esetben a visszaolvasztás sebessége több mint 4460 °C/perc (Liebermann et al., 2002). A szobahőmérsékleten történő visszaolvasztás percenként kevesebb, mint 196 °C/perc sebességet tesz lehetővé, ami a ZP károsodását eredményezheti (Shaw et al., 1997).

A visszaolvasztás során a krioprotektív anyagokat (CPA) ki kell vonni a sejtekből, mert azok magasabb hőmérsékleten toxikusak lehetnek – ehhez a sejteket több lépésben, az adott krioprotektív anyagokra nézve egyre kisebb koncentrációjú oldatban ekvibrálatják.

A rehidrációt megfelelő sebességgel kell elvégezni, mert a sejtbe gyorsan beáramló víz miatt sérülhetnek a sejtorganellek. A sejtek túl gyors vízfelvételének megakadályozása érdekében az oldatokhoz nem permábilis CPA-t (leggyakrabban szaharózt) adnak – ezzel növelve az ozmolalitást, ami egyben a CPA-k sejtbe kiáramlását segíti (Hochi et al., 2001).

2.3.5. Sejtkárosodások a hűtés/visszaolvasztás során

Sertés gaméták/embriók hőmérséklet-változással kapcsolatos rendkívüli érzékenységének okait több kutatócsoport is vizsgálta.

A nagy koncentrációban alkalmazott CPA-k toxicitása az ekvibráció körülményeinek (hőmérséklet, idő) helyes megválasztásával csökkenthető. Az ekvibrációt lehetőleg szobahőmérsékleten, több lépcsőben, rövid idő alatt (néhány perc) kell elvégezni (Isachenko et al., 1998).

Ghetler (2006) emberi petesejtek vitrifikációja során, a ZP szerkezetének megváltozásáról és a kortikális granulumok idő előtti exocitózisáról számolt be – melyek felelősek lehetnek a felolvasztást követő alacsony termékenyülési arányért.

Petesejtek vitrifikációjával kapcsolatos kutatásokban számos sejten belüli változást figyeltek meg. A hűtési eljárás során a petesejtekben csökkent a plazmamembrán szelektív permeabilitása, megváltozott a meiotikus orsó mikrofilamentumainak, mikrotubulusainak a szerkezete, sérültek a sejteket összekötő struktúrák, a mitokondriumok mérete megnőtt, a membránok depolimerizálódtak és kromoszómák széteséséről számoltak be (Johnson – Pickering, 1987; Aman – Parks, 1994; Diez et al., 2005)

Embriók vitrifikációjával kapcsolatban hasonló citoszkeletális változásokat figyeltek meg (Dobrinsky, 1996b). Az intracelluláris lipidmolekulák kapcsolatban vannak a sejtvezeték elemeivel; hűtés során ezek a kapcsolatok sérülhetnek, ami a petesejt/embrió citoszkeletonjának irreverzibilis változásait okozhatja (Fujihara et al., 2004b).

Ismert, hogy a sertés gaméták és embriók citoplazmájának lipidtartalma nagyobb, mint egyéb gazdasági állatoké. A magas lipid/fehérje arány meghatározó a sejt hipotermiás érzékenységére nézve (Dobrinsky, 1997). A korai embriókban nagyobb lipidtartalmat figyeltek meg, mint a későbbi stádiumban lévő embriók esetében; sertés embriók citoplazmájában a blasztociszták kibújását követően csökken a neutrális zsírcseppek mérete. Úgy tűnik, hogy a lipidekre a kibújáshoz és az embrió normális fejlődéséhez van szükség (Nagashima et al., 1996).

Mikromanipulációval és centrifugálással a petesejtben/embrióban lévő lipidcseppek eltávolíthatók, illetve polarizálhatók. Mindkét eljárás javította a petesejt/embriók túlélési arányát a felolvasztást követően (Nagashima et al., 1996, 1999; Esaki et al., 2004).

A különböző fejlettségű embriók eltérően tolerálják a hűtési hőmérsékletet. Megfigyelték, hogy 5 napos morula embriók nem éltek túl az eljárást, míg az expandálódott blasztociszták 30 %-a, a kibújt blasztociszták 40 %-a életképes volt a felolvasztást követően (Dobrinsky, 2002). Nagashima (1996) szerint a vitrifikációhoz optimális embrióméret kibújt blasztociszták esetében 150–300 μm ; szerinte minél nagyobb az embrió mérete, annál rosszabb az eljárás hatékonysága.

A krioprezerváció során reaktív oxigén gyökök (ROS) alakulhatnak ki, melyek meghatározó tulajdonsággal bírnak a petesejt/embriók visszaolvasztást követő élet- és fejlődőképességére nézve (Kelly et al., 2006). Ez a káros hatás azonban kiküszöbölhető, ha a vitrifikációs oldatokat EDTA-val (0,1 mM) és/vagy GSH-val (1 mM) és/vagy β -merkaptotetanollal (100 mM) egészítik ki (Aksoy et al., 1999, Nedambale et al., 2006).

A krioprezerváció eredményességének javítása érdekében lehetőség van citoszkeleton-, membrán- és fehérjestabilizátorok alkalmazására is. A petesejt/embriók sejtvezetének épsége esszenciális a cito- és

kariokinézishez, az embrió alakjának fenntartásában, a sejtciklus normális lezajlásához és a sejten belüli kommunikációhoz.

Petesejtek/embriók hűtés során fellépő károsodásokkal szembeni ellenálló-képessége növelhető citohalazin-B-t (CB) tartalmazó oldatban történő pre-ekvilibráltatással. A CB a citoskeletont reverzibilisen rugalmasabbá teszi, így védve azt a hűtés során (Dobrinsky et al., 2000).

Pribenszky (2004) és Molnár (2002) a fagyasztási eljárás során megnövelt hidrosztatikai nyomással javították egér blasztociszták túlélését.

Az embriók krioprezervációval szembeni toleranciája növelhető kokultúrák alkalmazásával. Úgy tűnik, hogy a petesejtek/embriók granulózasejtekkel való együtt-inkubálása jobb hatásfokú, mint a petevezetőből származó epitel sejtekkel való kokultiváció (Leibo – Loskutoff, 1993).

3. ANYAG ÉS MÓDSZER

A dolgozatban bemutatott kutatásokat a Nyugat–Magyarországi Egyetem, Mezőgazdaság- és Élelmiszertudományi Kar, Állattudományi Intézet Laboratóriumában és a Murciai Állatorvos-tudományi Egyetem (Murcia, Spanyolország) Kutatólaboratóriumában végeztük el 2004 és 2007 között.

3.1. Sertés petesejtek aktiválása

Vizsgálataink célja sertés petesejtek kémiai úton, különböző vegyszerekkel történő aktiválásának kiváltása, illetve az alkalmazott kemikáliák embriófejlődésre gyakorolt hatásának vizsgálata volt.

3.1.1. Alkalmazott vegyszerek

A kísérletekhez szükséges vegyszereket a Sigma–Aldrich (Budapest) Kft-től és a Werft–Chemie GmbH-től (Bécs) vásároltuk.

A vizsgálatokhoz szükséges petefészkeket a jánossomorjai vágóhíd biztosította. A petefészkek laboratóriumba szállítása 38 °C-os fiziológiás sóoldatban (0,9 % [w/v] NaCl) történt.

Ezt követte az ováriumok fertőtlenítése háromszori, CETAB–oldatban (hexadecil-trimetil-ammónium–bromid; H–5882) és háromszori, fiziológiás sóoldatban történő átmosással.

A kumulusz–petesejt komplexek (COC) kinyeréséhez Hepes–PVA oldatot használtunk (1. melléklet).

A petesejteket TCM-199 oldatban maturáltattuk, melyet sertés follikulusfolyadékkal (PFF), nátrium-piruváttal, ciszteaminnal, glutaminnal, antibiotikumokkal, és az érés első 20 órájában hormonokkal egészítettünk ki (2. a, b, c melléklet).

Az aktiválás során alkalmazott alaphévíz nátrium-laktáttal, és piruváttal kiegészített, Ca^{2+} –mentes NCSU-37 oldat volt (3. melléklet), melyet a kezelési csoportoknak megfelelő vegyszerekkel (stroncium-kloriddal, 6-dimetil-aminopurinnal, cikloheximiddel, illetve ezek kombinációjával) egészítettünk ki (4. melléklet).

Az embriótenyésztés NCSU-37 oldatban (5. melléklet) történt.

3.1.2. Petesejtek gyűjtése

Kísérleteinkben vágóhídról származó, nagy fehér fajtacsoportba tartozó, prepuberális sertés petefészkekből nyert COC-eket használtunk. A petefészkeket, a fertőtlenítést követően, 38 °C-os vízfürdőben, fiziológias sóoldatban tartottuk a felhasználásig, amely egy órán belül megtörtént.

Vizsgálatainkhoz sárgatest és ciszta nélküli petefészkeket használtunk. A 3–6 mm átmérőjű folliculusokból a tüszőfolyadékot és a benne lévő COC-eket 10 ml-es kézifecskendő és a hozzá csatlakoztatott 18G-jelű tű segítségével szívtuk le, majd műanyag centrifugacsőbe gyűjtöttük.

Miután a sejtek leülepedtek, a felülúszó eltávolítása után a visszamaradt sejteket Hepes–TCM-199 oldattal reszuszpendáltuk, és megkezdtuk a COC-k kiválogatását.



10. kép: Sertés petefészkek az aspirálás előtt
[Saját felvétel]

3.1.3. Petesejtek *in vitro* érlelése

A COC-eket sztereomikroszkóp (Nikon) segítségével (40× nagyítás) kiválogattuk. Az IVM-hoz jó minőségű, többretegű, kompakt kumuluszállománnyal rendelkező petesejteket használtunk fel.

A COC-eket ezt követően háromszor átmostuk az IVM-hoz használt oldatban, majd „négylyukú” tenyésztőedényben (NUNC), 50 COC/500 μ l IVM-oldatban, 42 órán keresztül, 5 % CO₂-tartalmú gázkeverékben, 38,5 °C-on maturáltattuk. A maturáció első 20 órájában az IVM-oldatot 10 IU/ml

hCG-vel és PMSG-vel egészítettük ki; ezt követően az érlelés hormonmentes oldatban történt (2. a, b, c melléklet).

3.1.4. Az *in vitro* maturáció sikerének értékelése

A maturáció sikerességének elbírálása a sejtmag érésének vizsgálatával (metafázis-II osztódási stádiumú petesejtek számának meghatározása), illetve a kumuluszállomány morfológiai értékelésével (expandálódási arány kifejezése) történt.

A maturáció végén, ismétlésenként 30–30 COC-t, véletlenszerűen kiválogattunk. Feljegyeztük az expandálódási arányt, majd pipetta segítségével eltávolítottuk a kumuluszsejteket a petesejtek felszínéről. Ezt követően az oocitákat ecetsav és etanol, 1:3 arányú keverékében 3 napig fixáltuk, majd 0,1 %-os ecetsavas–orceinnel festettük, és mikroszkóp segítségével (400× nagyítás) meghatároztuk, hogy a petesejtek mekkora része érte el a M-II állapotot.

3.1.5. Petesejtek aktiválása

42 óra maturációt követően az expandált kumuluszállománnyal rendelkező, jó minőségű (egyenletesen sötét ooplazmával, és látható sarkitesttel rendelkező) petesejtek felületéről pipettázással eltávolítottuk a kumuluszsejteket.

A petesejteket háromszor átmostuk (a csoportnak megfelelő vegyszerkiegészítést tartalmazó) 2–2 ml Ca^{2+} -mentes NCSU-37 oldatban.

Ezt követően csoportonként 90–120 petesejtet, a csoportnak megfelelő vegyszer-kiegészítést tartalmazó, aktiváláshoz használt Ca^{2+} -mentes NCSU-37 oldatban 5 órán keresztül, 38,5 °C-os, 5 % CO_2 -tartalmú gázkeverékben, termosztátban inkubáltuk.

3.1.6. Az aktiválódás meghatározása

Az aktiválódás eredményességét az öt órás kezelést követő inkubáció 7. órájában határoztuk meg. A petesejteket ecetsav és etanol 1:3 arányú keverékében fixáltuk, 0,1 %-os ecetsavas–orceinnel festettük, majd mikroszkópban vizsgáltuk.

Aktiváltaknak tekintettük azokat az oocitákat, melyekben pronukleusz(oka)t tudtunk megfigyelni.

Egyes petesejteket – az előmagok szemléletesebb bemutatása érdekében – Hoechst 33342 (B–2261)-vel festettünk meg.

3.1.7. Az embriók *in vitro* tenyésztése

Az öt órás kezelést követően, a petesejteket 2–2 ml NCSU-37 oldatban háromszor átmostuk, majd 500 µl nagyságú, ásványi olajjal (M–8410) fedett NCSU-37 oldatba (30 petesejt/500 µl médium) helyeztük.

Az embriókat 6 napon keresztül, 38,5 °C-os, 5 % CO₂-tartalmú gázkeverékben, termosztátban inkubáltuk.

3.1.8. Az embriófejlődés eredményességének meghatározása

48 órával (2. kísérletsorozat), illetve 6 nappal (3. kísérletsorozat) az aktiválást követően a petesejteket/embriókat ecetsav és etanol, 1:3 arányú keverékében 3 napig fixáltuk, majd 0,1 %-os ecetsavas–orceinnel festettük, és mikroszkóp segítségével meghatároztuk az embriók fejlettségi állapotát.

3.1.9. Kísérleti terv

Az *in vitro* maturáció (42h) hatékonyságának meghatározásához ismétlésenként 30–30 petesejtet vizsgáltunk meg (értékeljük az expandálódási arányt és a sejtmag érését).

1. kísérletsorozat

A kísérlet során *in vitro* maturáltatott petesejteket aktiváltunk 10 mM stroncium-kloriddal az **S-csoportban** (petesejtek száma (n)=145), 2 mM 6-dimetil-aminopurinnal a **D-csoportban** (n=144) és 0,04 mM cikloheximiddel a **CX-csoportban** (n=143).

A kezelést stroncium-klorid (15,85 mg/ml) és cikloheximid (1 mg/ml) kombinációjával (**SCX-csoport**; n=142) illetve stroncium-klorid (15,85 mg/ml) és 6-DMAP (32,36 mg/ml) kombinációjával (**SD-csoport**; n=144) is elvégeztük.

Az öt órás kezelést követően megvizsgáltuk a nem aktiválódott (M-II állapotban maradt), az aktiválódott (pronukleusszal rendelkező), illetve a kezelés során degenerálódott sejtek arányát.

A **kontroll csoportban** (n=127) a petesejteket 42 órán keresztül maturáltattuk, majd 7 órán keresztül NCSU-37 oldatban inkubáltuk.

2. kísérletsorozat

A vizsgálathoz az első kísérletsorozathoz hasonló módon kezeltük a petesejteket [**S-csoport** (n=188), **D-csoport** (n=169), **CX-csoport** (n=159), **SD-csoport** (n=191), **SCX-csoport** (n=158)].

A kezelés után az oocitákat 48 órán keresztül NCSU-37 oldatban kultiváltuk.

A **kontroll csoportban** (n=90) a petesejteket 42 órát maturáltattuk, majd 48 órán keresztül NCSU-37 oldatban inkubáltuk.

Ezt követően a petesejteket/embriókat ecetsav és etanol 1:3 arányú keverékében fixáltuk, és 0,1 %-os ecetsavas-orceinnel festettük, majd meghatároztuk, az embriófejlődést megkezdett sejtek arányát.

3. kísérletsorozat

A kémiai kezelést követően [**S-csoport** (n=68), **D-csoport** (n=97), **CX-csoport** (n=95), **SD-csoport** (n=80), **SCX-csoport** (n=81)] a petesejteket/embriókat 6 napig 500 µl NCSU-37 oldatban tenyésztettük, majd a második kísérletsorozatban leírt módon fixáltuk és festettük.

Ezt követően megvizsgáltuk az embriók fejlődését, és meghatároztuk a blasztociszták számát.

A **kontroll csoportban** (n=90) a petesejteket 42 órán keresztül maturáltattuk, majd 6 napig NCSU-37 oldatban inkubáltuk.

3.1.10. Statisztikai vizsgálat

A vizsgálatokat háromszor ismételtük meg.

A maturációs rátát, a pronukleusz-képződést, az embriófejlődés arányát többtényezős varianciaanalízissel, a STATISTICA program ANOVA rendszerével, Duncan's-teszt segítségével elemeztük. Szignifikáns különbségként értékeltük, ahol a valószínűség $P < 0,05$.

3.2. Sertés petesejtek krioprezervációja

Az első kísérletsorozatban megvizsgáltuk, hogy a kumuluszsejteknek milyen hatása van az érett (M-II) petesejtek vitrifikációs eljárással szembeni érzékenységére.

Második kísérletsorozatunkban értékeltük, hogy az éretlen (csírahólyag; GV-állapotú), illetve az *in vitro* maturáltatott (M-II) petesejtek hogyan reagálnak a vitrifikációs eljárásra.

3.2.1. Alkalmazott vegyszerek

A kísérletekhez szükséges vegyszereket a Sigma–Aldrich (Budapest) Kft-től és a Werft–Chemie GmbH-től (Bécs) vásároltuk.

Vizsgálatainkhoz a petefészkeket a jánosomorjai és a máriakálnoki vágóhidak biztosították.

A petefészkek laboratóriumba szállítása 38 °C-os fiziológiás sóoldatot (0,9 % [w/v] NaCl) tartalmazó termosztóban történt.

Az ováriumok fertőtlenítése CETAB, illetve fiziológiás sóoldatban történő háromszori átmosással történt.

A kumulusz–petesejt komplexek (COC) kinyeréséhez Hepes–PVA oldatot használtunk (1. melléklet).

A petesejteket TCM-199 oldatban maturáltattuk, melyet sertés folliculusfolyadékkal (PFF), nátrium-piruváttal, ciszteaminnal, glutaminnal, antibiotikumokkal, és az érés első 20 órájában hormonokkal egészítettünk ki (2. a, b, c melléklet).

A vitrifikációs eljárás során használt alapoldat Hepes–TCM-199 médium (M–7528) volt, amit 5 mg/ml BSA-val egészítettünk ki (HM).

A fagyasztás során alkalmazott oldatok összetételét a 6. a, b mellékletek tartalmazzák. Krioprotektív anyagként etilén-glikolt (EG) és dimetil-szulfoxidot (DMSO) használtunk.

A visszaolvasztáshoz szükséges oldatok összetétele a 7. a, b mellékletben található. A krioprotektív anyagok kivonásához és a rehidrációhoz az oldatokhoz különböző koncentrációban szaharózt adtunk.

Az *in vitro* termékenyítéshez módosított TBM (mTBM) oldatot (Abeydeera et al., 1997) használtunk (8. melléklet).

A termékenyítést követő 24 órás kultiváció NCSU-23 oldatban (9. melléklet) történt.

3.2.2. Petesejtek gyűjtése

A petesejtek gyűjtését a 3.1.2. fejezetben leírtakkal azonos módon végeztük el.

3.2.3. Petesejtek *in vitro* érlelése

Az IVM kivitelezése a 3.1.3 fejezetben bemutatott módon történt.

3.2.4. Az *in vitro* érlelés sikerének értékelése

Az IVM hatékonyságának meghatározása a 3.1.4. fejezetben alkalmazott fixálási és festési eljárást követő mikroszkópos vizsgálattal történt.

3.2.5. Petesejtek vitrifikálása OPS módszerrel

A petesejteket „nyitott végű műszalma” (OPS) eljárással vitrifikáltuk (Vajta et al., 1997).

A petesejtek fagyasztást megelőző ekvibrálására krioprotektív anyagokat tartalmazó oldatokban 2 lépcsőben történt. Az első ekvibrálás (3 perc) során alkalmazott oldatban a krioprotektív anyagok (EG és DMSO) koncentrációja 2–2 M volt (6. b melléklet), míg a második ekvibráció (1 perc) 6,5–6,5 M EG-t és DMSO-t tartalmazó oldatban történt (6. c melléklet).

A második ekvibrációt követően a petesejteket tartalmazó, 10 µl nagyságú médiumcseppeket nyitott végű műszalmákba szívtuk fel (kapilláris elven), majd azonnal folyékony nitrogént (–196 °C) tartalmazó tartályba helyeztük.

3.2.6. Petesejtek visszaolvasztása

A fagyasztáshoz hasonlóan a petesejtek visszaolvasztása is több lépcsőben történt. A műszalmákat a folyékony nitrogénből való eltávolítást követően, ujjaink közé fogva (~36 °C) melegítettük fel fél perc alatt. Ezután a petesejteket 5 percre, a felolvasztáshoz használt M1-oldatba (7. a melléklet) helyeztük. A második ekvibráció (5 perc) kisebb szaharóz-koncentrációjú oldatban (M2-oldat; 7. b melléklet) történt, végül a petesejteket HM-oldatba (6. a melléklet) helyeztük szintén 5 percre.

3.2.7. Petesejtek vizsgálata

A visszaolvasztást követően mikroszkóp segítségével (400× nagyítás) megvizsgáltuk a petesejtek morfológiáját.

Normális morfológiájú petesejtnek tekintettük – és használtuk a későbbi IVF-hez – azokat a petesejteket, melyek citoplazmája egységesen sötét és homogén volt, a zona pellucida (ZP) nem sérült, illetve a petesejt alakja normális volt. A világosbarna citoplazmával vagy sérült ZP-val rendelkező oocitákat abnormálisnak tekintettük.

A visszaolvasztást követően történt a petesejtek ZP-jának, és plazmamembránjának a vizsgálata is. 0,1 % pronáz oldatba helyeztünk csoportonként 30–40 petesejtet, és megmértük, hogy a ZP mennyi idő alatt bomlott le, továbbá megfigyeltük (400× nagyítás) a plazmamembrán szerkezetét is.

3.2.8. *In vitro* termékenyítés

Miután a morfológiailag normális petesejteket háromszor átmostuk a fertilizációhoz használt (mTBM) oldatban, majd 90 µl nagyságú, ásványi olajjal (M–8410) fedett mTBM médiumcseppbe helyeztük (30 petesejt/90 µl mTBM) és a termékenyítésig termosztátba (5 % CO₂, 38,5 °C) tettük.

A termékenyítéshez fagyasztott/visszaolvasztott kanspermát használtunk. A műszalmákat 37 °C-os vízfürdőben, 1 perc alatt felolvasztottuk, majd 8 ml előinkubált mTBM-be helyeztük a spermát, és két percen keresztül 3000/perc fordulatszámra centrifugáltuk. A kapott pelletet reszuszpendáltuk 70 µl mTBM oldattal. Thoma–sejtszámláló kamra segítségével meghatároztuk a koncentrációt, majd beállítottuk 1×10⁵ spermium/ml-re. Ezt követően 10 µl spermium–szuszpenziót adtunk a 90 µl nagyságú „termékenyítő”–médiumcsepphez, majd a petesejteket és a spermiumokat 4 órán keresztül termosztátban együtt inkubáltuk.

3.2.9. Termékenyített petesejtek kultiválása

A termékenyítés után pipettázással eltávolítottuk a petesejtek felszínéről a spermiumokat és – amelyek csoportokban az oociták még nem voltak korábban lecsupaszítva – a kumuluszsejteket.

Ezután a petesejteket háromszor átmostuk 2–2 ml NCSU-23 oldatban, majd 500 µl előinkubált NCSU-23 médiumba helyeztük, amit 24 órás kultiválás követett (38,5 °C, 5% CO₂).

3.2.10. Termékenyülési ráta meghatározása

Az IVF után 24 órán keresztül kultiváltuk a petesejteket, majd ecetsav és etanol 1:3 arányú keverékében fixáltuk, és 0,1 %-os ecetsavas-orceinnel festettük.

Mikroszkóp segítségével (400× nagyítás) megvizsgáltuk az oocitákat: termékenyültnek tekintettük azokat, melyekben pronukleuszokat, kondenzált/dekondenzálódott kromatinnal rendelkező hímvarsejtet, vagy a perivitellinális térben a második sarkitestet tudtuk megfigyelni.

3.2.11. Kísérleti terv

1. kísérletsorozat

In vitro maturáltatott, kumuluszsejtekkel körülvelt [**K-csoport** (petesejtek száma (n)=255)], illetve a maturáció után lecsupaszított (kumuluszsejtek pipettázással történő eltávolítása) petesejteket [**CS-csoport**, n=215] vitrifikáltunk.

A **kontroll csoportban** (n=217) a petesejteket az IVM után termékenyítettük, majd 24 órán keresztül kultiváltuk NCSU-23 oldatban.

Megvizsgáltuk, hogy a visszaolvasztást követően a petesejtek mekkora hányadának volt normális morfológiája, illetve mekkora részük degenerálódott a vitrifikációs eljárás során.

A visszaolvasztást követően, a K- és a CS-csoportokban, illetve a kontroll csoportban, a petesejteket 0,1 % pronázzal kezeltük, és megmértük a zona pellucida feloldódásának idejét, továbbá megfigyeltük az ooplazma membránjának épségét is.

Az IVF után feljegyeztük, hogy mekkora volt a fertilizációs ráta.

2. kísérletsorozat

Éretlen [kumuluszsejtekkel körülvelt = **GK-csoport** (n=510) illetve pipettázással lecsupaszított = **GCS-csoport**, n=560)] és *in vitro* maturáltatott, kumuluszsejtekkel körülvelt [**MK-csoport** (n= 350)] petesejteket vitrifikáltunk az OPS eljárással.

Megvizsgáltuk, hogy a petesejtek fagyasztással kapcsolatos érzékenysége hogyan változik az éretlen és az *in vitro* maturáltatott petesejtek esetében.

A visszaolvasztást követően a M-II petesejteket (MK-csoport) termékenyítettük, a GV-petesejteket (GK-csoport, és GCS-csoport) elsőként maturáltattuk, majd azt követően szintén termékenyítettük.

A **kontroll csoport**ban (n=130) a petesejteket maturáltattuk, majd termékenyítettük és a termékenyített oocitákat 24 órán keresztül NCSU-23 oldatban inkubáltuk.

Megvizsgáltuk a visszaolvasztást követő morfológiai változásokat a petesejtek szerkezetében és a sejtmag érését a vitrifikációs eljárás előtt (MK-csoport), illetve a vitrifikáció után (GK-csoport és GCS-csoport) maturáltatott petesejtek esetében, továbbá feljegyeztük a termékenyülési arányt a különböző csoportokban.

3.2.12. Statisztikai vizsgálat

Mindkét kísérletsorozatot háromszor ismételtük meg.

A kapott eredményeket a STATISTICA programcsomag ANOVA rendszerével, Duncan's multiple range test segítségével elemeztük. Szignifikáns különbségnek tekintettük, ahol a valószínűség $P < 0,05$ volt.

3.3. Mangalica petesejtek *in vitro* maturáltatása és krioprezervációja

Tudomásunk szerint mangalica petesejtek vitrifikációs hűtésével eddig nem foglalkozott egy kutatócsoport sem.

Értékeljük, hogy a mangalica petesejtek milyen hatékonysággal használhatók az *in vitro* maturációs rendszerben.

Továbbá megvizsgáltuk, hogy a mangalica petesejtek hűtéssel szembeni toleranciája a nagy fehér petesejtekhez képest hogyan alakul, illetve a visszaolvasztást követő IVF segítségével sikeres embriófejlődés indukálható-e a mangalica esetében.

3.3.1. Alkalmazott vegyszerek

A kísérletekhez szükséges vegyszereket a Sigma-Aldrich (Budapest) Kft-től és a Werft-Chemie GmbH-től (Bécs) vásároltuk.

A vizsgálataink során felhasznált mangalica petefészkeket a Pick Szeged Rt. és a lábodi vágóhíd biztosította, míg a nagy fehér sertés ováriumokat a jánossomorjai vágóhídról szereztük be.

A petefészkeket 38 °C-os fiziológiás sóoldatot (0,9 % [w/v] NaCl) tartalmazó termoszban szállítottuk a laboratóriumba, majd CETAB-, illetve fiziológiás sóoldatban háromszor átmosva fertőtlenítettük.

A kumulusz–petesejt komplexek (COC) kinyeréséhez Hepes–PVA oldatot használtunk (1. melléklet).

A petesejteket TCM-199 oldatban maturáltattuk, melyet sertés follikulusfolyadékkal (PFF), nátrium-piruváttal, ciszteaminnal, glutaminnal, antibiotikumokkal, és az érés első 20 órájában hormonokkal egészítettünk ki (2. a, b, c melléklet).

A vitrifikációs eljárás során használt alapoldat Hepes–TCM-199 médium (M–7528) volt, melyet 5 mg/ml BSA-val egészítettünk ki (HM).

A fagyasztás során alkalmazott oldatok összetételét a 6. a, b mellékletek tartalmazzák. Krioprotektív anyagként etilén-glikolt (EG) és dimetil-szulfoxidot (DMSO) használtunk, melyek végső koncentrációja 6,5–6,5 M volt.

A visszaolvasztáshoz szükséges oldatok összetétele a 7. a, b mellékletben található. A krioprotektív anyagok kivonásához és a rehidrációhoz az oldatokhoz különböző koncentrációban szaharózt adtunk.

Az *in vitro* termékenyítéshez módosított TBM (mTBM) oldatot (Abeydeera et al., 1997) használtunk (8. melléklet).

A termékenyítést követő, 4 napig tartó kultiváció NCSU-23 oldatban (9. melléklet) történt.

3.3.2. Petesejtek gyűjtése

A petesejtek gyűjtését a 3.1.2. pontban leírtakkal megegyezően végeztük el.

3.3.3. Petesejtek *in vitro* érlelése

Az IVM kivitelezése a 3.1.3 fejezetben bemutatott módon történt.

3.3.4. Az *in vitro* érlelés sikerének értékelése

Az IVM hatékonyságát a 3.1.4. fejezetben alkalmazott fixálási és festési eljárást követő mikroszkópos vizsgálattal határoztuk meg.

3.3.5. Petesejtek vitrifikálása

A petesejtek fagyasztása a 3.2.5. fejezetben leírt módon történt.

3.3.6. Petesejtek visszaolvasztása

A visszaolvasztás módja megegyezett a 3.2.6. pontban leírtakkal.

3.3.7. Petesejtek vizsgálata a visszaolvasztást követően

A visszaolvasztás után mikroszkóp segítségével megvizsgáltuk a petesejtek morfológiáját.

Normális morfológiájúnak tekintettük – és használtuk a későbbi IVF-hoz – azokat a petesejteket, melyek citoplazmája egységesen sötét és homogén volt, a zona pellucida (ZP) nem sérült, illetve a petesejtek alakja normális volt. A világosbarna citoplazmával, illetve fragmentálódott ZP-val rendelkező oocitákat abnormálisnak tekintettük.

3.3.8. *In vitro* termékenyítés

A visszaolvasztott és a kontroll csoportban lévő petesejtek termékenyítése a 3.2.8. fejezetben bemutatott módon történt.

3.3.9. Az embriók *in vitro* tenyésztése

A termékenyítést követően, a petesejteket háromszor átmostuk az embriótenyésztéshez használt oldatban, majd 30 petesejt/500 µl NCSU-23 oldatban tenyésztettük 4 napon keresztül, 38,5 °C-on, 5% CO₂-tartalmú gázkeverékben.

3.3.10. Az embriófejlődés eredményességének meghatározása

Az embriófejlődést 4 napos kultiváció után határoztuk meg. Az embriókat a következő csoportok szerint osztályoztuk: embriófejlődés nem indult el, illetve fejlődést megkezdett petesejtek (2-sejtes, 4-sejtes, 8-sejtes, morula embrió).

3.3.11. Kísérleti terv

1. kísérletsorozat

Mangalica [**M-csoport** (n=310)] és nagy fehér sertés [**NF-csoport** (n=330)] petesejtek maturációjának hatékonyságát értékeltük az expandálódási arány és a sejtmag érése alapján.

2. kísérletsorozat

Mangalica és a nagy fehér sertés petesejtek vitrifikációs eljárással szembeni érzékenységet hasonlítottuk össze a visszaolvasztást követő degenerálódási arány alapján.

A vitrifikációs eljárás során *in vitro* maturáltatott (42 h), kumuluszsejtekkel körülvett mangalica [**M-csoport** (n=171)] és nagy fehér [**NF-csoport** (n=183)] sertés petesejteket használtunk.

Kontroll csoportként mangalica [**KM-csoport** (n=202)] és nagy fehér [**KNF-csoport** (n=193)] petesejteket maturáltattunk, majd termékenyítettünk.

3. kísérletsorozat

In vitro maturáltatott, az OPS eljárással fagyasztott/visszaolvasztott, termékenyített mangalica és nagy fehér sertés petesejtek embriófejlődését hasonlítottuk össze [**M-csoport** (n=28); **NF-csoport** (n=53); **KM-csoport** (n=130); **KNF-csoport** (n=136)], 4 napos kultiváció után.

3.3.12. Statisztikai vizsgálat

Minden vizsgálatot háromszor megismételtünk.

Az eredmények értékelése a STATISTICA programmal (ANOVA) történt. A csoportok közötti különbségeket Duncan's teszttel vizsgáltuk. Szignifikáns különbségnek azt tekintettük, ahol a valószínűség $P < 0,05$ volt.

4. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK

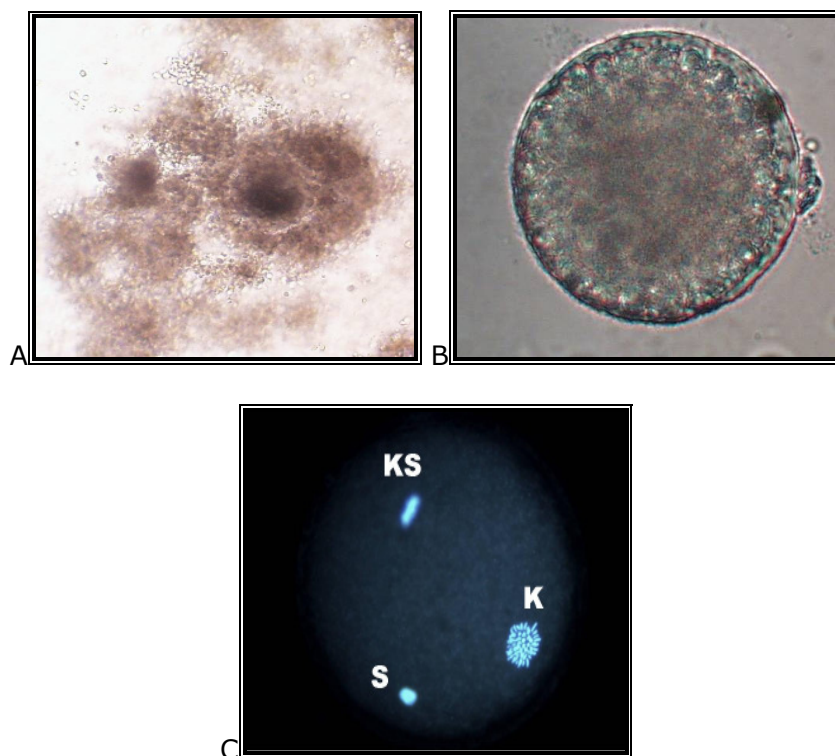
4.1. Sertés petesejtek aktiválása

4.1.1. Eredmények

Kísérleteinkben *in vitro* maturáltatott (IVM) petesejteket (M-II) használtunk, összesen 2401 petesejtet vizsgáltunk.

42 óra IVM-t követően meghatároztuk a maturációs rendszer hatékonyságát az expandálódási arány és a sejtmag érése alapján.

Ismétlésenként 30–30 petesejtet vizsgálva a következő eredményeket kaptuk: az expandálódási arány $93,33 \pm 1,92$ %, míg a sejtmag érése (M-II petesejtek aránya) $77,78 \pm 1,92$ % volt.

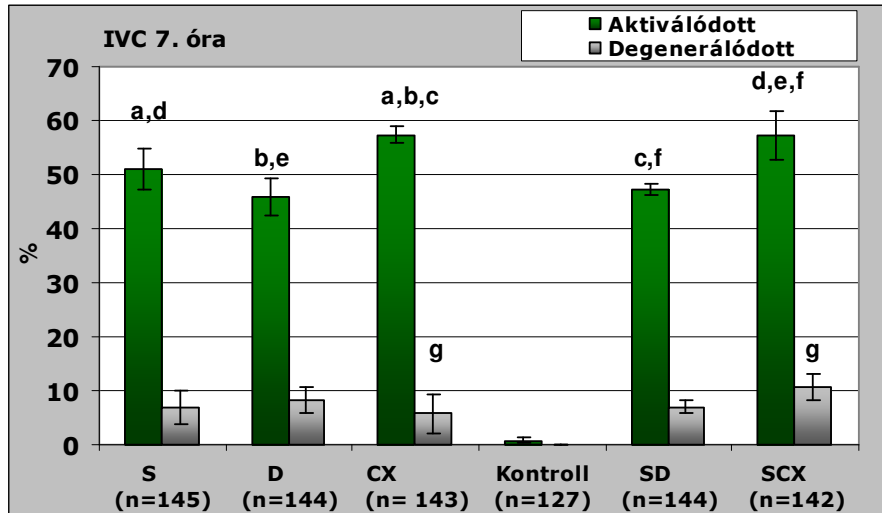


11. kép: Sertés petesejtek 42 óra IVM után: expandálódott COC (A); petesejt sarkitesttel [ZP eltávolítva] (B); M-II petesejt [KS: kumuluszsejt, K: M-II kromoszómák; S: sarkitest](C)

[Saját felvétel]

1. kísérletsorozat eredményei

Az aktiválást követő inkubálás 7. órájában megvizsgáltuk, hogy a petesejtek mekkora része aktiválódott (rendelkezett pronukleusszal) és a kezelések milyen hatással voltak a petesejtek aktiválódására. Megállapítottuk a kezelés során degenerálódott oociták arányát is (1. ábra).



1. ábra: A különböző kezelések hatása a petesejtek aktiválódására és degenerálódására. Zárójelben a kezelt petesejtek (n) száma. *a,b,c,d,e,f,g* Az oszlopok közötti, statisztikailag igazolható különbségeket jelölik ($P < 0,05$).

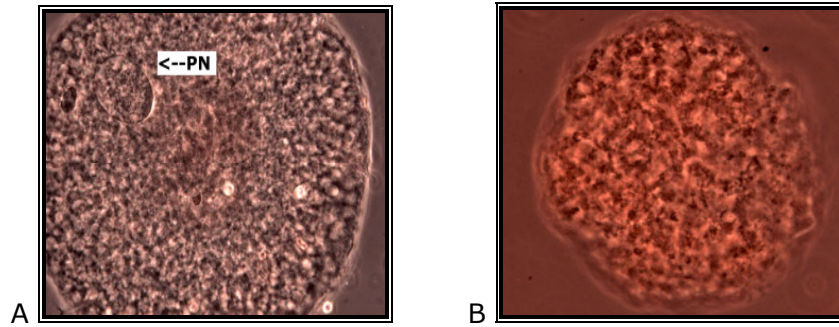
Az aktiválódási rátát vizsgálva megállapítottuk, hogy a CX-csoportban ($57,3 \pm 1,52$ %) és az SCX-csoportban szignifikánsan ($P < 0,05$) több petesejt aktiválódott, mint az S- ($50,96 \pm 3,72$ %), a D- ($45,91 \pm 3,39$ %) valamint az SD-csoportokban ($47,25 \pm 1,08$ %).

A kezelések petesejtek aktiválódására kifejtett hatása a kontroll csoporthoz képest statisztikailag igazolható: a kezelt csoportok mindegyike szignifikánsan ($P < 0,05$) nagyobb aktiválódást mutatott, mint a kezeletlen petesejtek.

A kontroll csoportban $0,78 \pm 0,45$ % spontán aktiválódást jegyeztünk fel.

A kezelések hatására az egyes csoportokban a petesejtek 5–11 %-a degenerálódott: S-csoport: $6,89 \pm 3,18$ %; D-csoport: $8,4 \pm 2,44$ %; CX-csoport: $5,71 \pm 3,48$ %; SD-csoport: $6,95 \pm 1,22$ %; SCX-csoport: $10,63 \pm 2,42$ %.

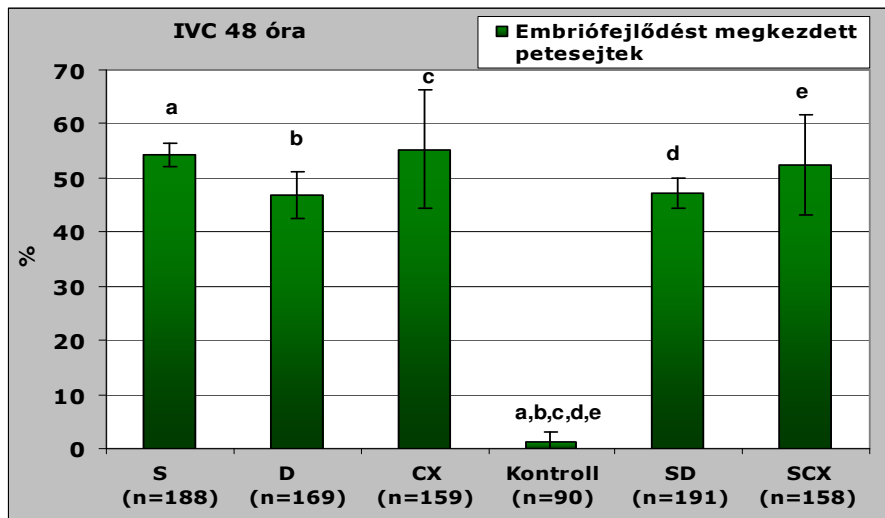
A csoportokat összehasonlítva megállapítottuk, hogy az SCX–csoportban ($10,63 \pm 2,42$ %) szignifikánsan ($P < 0,05$) nagyobb arányban degenerálódtak a petesejtek, mint a CX–csoportban ($5,71 \pm 3,48$ %).



12. kép: Sertés petesejt 1 pronukleusszal [PN](A); a kezelés hatására degenerálódtott petesejt (B) [Saját felvétel]

2. kísérletsorozat eredményei

Az aktiválódtott petesejtek inkubálásának 2. napján feljegyeztük az embriófejlődést megkezdett petesejtek számát (2. ábra).



2. ábra: A kezeléseket hatása az embriófejlődésre. ^{a,b,c,d,e}Az oszlopok közötti szignifikáns különbséget ($P < 0,05$) jelölik.

A kezelési csoportok a kontroll csoporthoz képest szignifikánsan ($P < 0,05$) nagyobb arányban kezdték meg az embriófejlődést. A kontroll csoportban $1,11 \pm 1,92$ % spontán embriófejlődést jegyeztünk fel: 90 petesejt közül egy spontán aktiválódott, és megkezdte az embriófejlődést, azonban 2–sejtes stádiumban megrekedt.

A kezelések embriófejlődésre gyakorolt hatása között szignifikáns különbséget ($P < 0,05$; $P < 0,001$) nem tudtunk kimutatni.

Megállapítható azonban, hogy az egyes kezelések hatására a petesejtek legalább 46 %-a fejlődésnek indult.

Értékeljük 48 óra kultiválást követően az embriófejlődés előrehaladottságát is (6. táblázat).

6. táblázat: Aktivált petesejtek fejlődése 48 órás inkubálás során. ^{a,b} A csoportok közötti, statisztikailag igazolható szignifikáns különbségeket jelölik ($P < 0,05$).

Csoportok	Fejlettségi állapot, IVC 48 óra db (%/±SEM)		
	2 sejt	4 sejt	8 sejt
S	58 (56,86±16,0)	31(30,39±11,94)	13(12,75±4,33) ^a
D	45(56,96±7,15)	23(29,11±7,22)	11(13,92±0,72) ^b
CX	47(53,41±2,62)	28(31,82±4,91)	13(14,77±2,29)
Kontroll	1(100±57,74)	0	0
SD	42(46,67±2,55)	28(31,11±4,09)	20(22,22±6,38) ^{a,b}
SCX	40(48,19±8,24)	27(32,53±4,41)	16(19,28±8,18)

A 2–sejtes embriókat tekintve nem találtunk szignifikáns különbségeket ($P < 0,05$; $P < 0,001$) a csoportok között.

A kontroll csoportban nem tudtunk megfigyelni 4–sejtes embriókat. Megállapítottuk, hogy a kezelési csoportok a kontroll csoporthoz képest szignifikánsan nagyobb ($P < 0,05$) arányban tartalmaztak 4–sejtes embriókat az embriófejlődés második napján.

A kezelések között szignifikáns ($P < 0,05$) különbséget (az embriófejlődés második napján megfigyelt 8–sejtes embriók tekintetében) az SD– és az S–; illetve az SD– és a D–csoportok között figyeltünk meg.

Megállapítottuk, hogy az embriófejlődés (az IVC második napján) előrehaladottabb volt az SD–csoportban ($22,22 \pm 6,38$ %), mint az S–($12,75 \pm 4,33$ %) és a D–csoportokban ($13,92 \pm 0,72$ %).

3. kísérletsorozat eredményei

Az IVC hatodik napján a kezelési csoportokban az embriók 10–19 %-a megrekedt a 2–sejtes állapotban. Szignifikáns különbséget ($P < 0,05$) az SD- és az SCX-csoportok között figyeltünk meg. Az SD-csoportban ($18,75 \pm 4,73$ %) az embriók nagyobb hányada rekedt meg 2–sejtes állapotban, mint az SCX-csoportban ($9,88 \pm 2,42$ %).

4–sejtes embriókat tekintve a kezelési csoportok között nem volt szignifikáns ($P < 0,05$ és $P < 0,001$) különbség (7. táblázat).

7. táblázat: 2–sejtes és 4–sejtes állapotban megrekedt embriók aránya az IVC 6. napján. ^a Csoportok közötti szignifikáns különbséget jelöli ($P < 0,05$).

Csoportok	Embriófejlődés stádiumai, IVC 6 nap db (% \pm SEM)	
	2–sejt	4–sejt
S	8 ($11,76 \pm 7,25$)	8 ($11,76 \pm 5,93$)
D	15 ($15,46 \pm 5,2$)	21 ($21,65 \pm 2,53$)
CX	12 ($12,63 \pm 1,45$)	13 ($13,63 \pm 8,5$)
SD	15 ($18,75 \pm 4,73$) ^a	12 ($15 \pm 2,66$)
SCX	8 ($9,88 \pm 2,42$) ^a	11 ($13,58 \pm 11,94$)
Kontroll	0	0

Az S-csoportban ($36,76 \pm 7,41$ %) és az SD-csoportban ($25 \pm 6,44$ %) szignifikánsan ($P < 0,05$) több embrió rekedt meg a 8–sejtes stádiumban, mint a CX-csoportban ($18,95 \pm 2,47$ %). Illetve az SCX-csoportban ($14,81 \pm 7,55$ %) szignifikánsan ($P < 0,05$) kevesebb 8–sejtes embriót figyeltünk meg, mint a CX-csoportban ($18,95 \pm 2,47$ %).

Morula embriók között az egyes csoportokban nem találtunk statisztikailag igazolható különbségeket ($P < 0,05$ és $P < 0,001$).

A különböző kezelések szignifikáns ($P < 0,05$) hatást gyakoroltak a blasztociszta embriók fejlődésére. Blasztociszta embriókat csak az S-, CX- és az SCX-csoportokban figyeltünk meg.

Az SCX-csoportban ($25,93 \pm 4,26$ %) és a CX-csoportban ($18,95 \pm 2,47$ %) szignifikánsan ($P < 0,05$) több blasztociszta embrió volt, mint az S-csoportban ($13,24 \pm 5,12$ %). Az SCX- és a CX-csoportokat vizsgálva megállapítottuk, hogy az SCX-csoportban ($25,93 \pm 4,26$ %) az embriók szignifikánsan ($P < 0,05$) nagyobb arányban fejlődtek hólyagcsírává, mint a CX-csoportban ($18,95 \pm 2,47$ %). (8. táblázat)

8. táblázat: Embriótenyésztés 6. napján 8–sejtes/morula/blasztociszta embriók aránya. ^{a,b,c,d,e,f} A csoportok közötti szignifikáns különbséget jelzik (P<0,05).

	Embriófejlődés stádiumai, IVC 6 nap		
	db (%±SEM)		
	8–sejt	Morula	Blasztociszta
S	25(36,76±7,41) ^a	18(26,47±2,24)	9(13,24±5,12) ^{d,e}
D	27(27,84±1,67)	34(35,05±2,1)	0
CX	18(18,95±2,47) ^{a,b,c}	34(35,79±14,48)	18(18,95±2,47) ^{d,f}
SD	20(25,0±6,44) ^b	33(41,25±4,55)	0
SCX	12(14,81±7,55) ^c	29(35,8±17,39)	21(25,93±4,26) ^{e,f}
Kontroll	0	0	0

4.1.2. Eredmények értékelése, következtetések

Kísérleteinkben *in vitro* maturáltatott (42 h) sertés petesejteket kezeltünk 5 órán keresztül különböző vegyszerekkel (10 mM stroncium-kloriddal; 0,04 mM cikloheximiddel, és 2 mM 6-dimetil-aminopurinnal, illetve ezek kombinációival). Megvizsgáltuk, hogy ezek a vegyszerek önmagukban milyen hatásfokkal képesek a petesejtek fejlődését elindítani egyéb előkezelések nélkül; illetve hogyan hatnak a későbbi embrionális fejlődésre.

Az általunk alkalmazott vegyszerek aktiváló hatásáról több kutatócsoport is beszámolt (Clarke et al., 1983; Roh et al., 2002). Ugyanakkor a legtöbb kísérletben ezeket a vegyszereket elektromos aktiválással, vagy ionoforokkal kombinálva használták, illetve közvetlenül az ooplazmába injektálták (Okada et al., 2003; Meo et al., 2004).

A kémiai és az elektromos aktiválást kombinálva Kragh (2005) 49 %-os blasztociszta–arányról számolt be.

A kísérleteinkben alkalmazott vegyszerekkel történő 5 órás kezelések hatására az *in vitro* maturáltatott sertés petesejtek 45,91–57,3 %-a aktiválódott. Az általunk elért aktivációs ráta hasonló képet mutat, más kutatócsoportok eredményeivel (Meo et al., 2004; Yi – Park, 2005).

A cikloheximid fehérjeszintézist gátló vegyület. Siracusa (1978) egér, Sirard (1989) szarvasmarha petesejteket aktivált sikeresen 10 µg/ml CX alkalmazásával.

Presicce és Yang (1994) etanol és cikloheximid kombinált kezelés hatását vizsgálva bemutatta, hogy az etanol által megemelt Ca²⁺–szint inaktiválta a

citosztatikus faktort (CSF), a cikloheximid pedig a CSF újratermelésének gátlásával csökkentette az MPF aktivitását.

A CX azonban sertés petesejtek esetében egyes kutatók szerint önmagában nem képes kiváltani az aktiválódást (Nussbaum – Prather, 1995). Ezzel szemben, Yi és Park (2005) sikeres aktivációról számolt be cikloheximid alkalmazásakor, azonban kísérleteikben a CX-kezelést a petesejtek 8 % etanolt tartalmazó NCSU-23 oldatban történő 10 perces inkubálása előzte meg – mint Presicce és Yang (1994) fent említett kísérleteiben.

Vizsgálatainkban a CX-csoportban 0,04 mM cikloheximiddel, az SCX-csoportban 1mg/ml CX és 15,85 mg/ml stroncium-klorid kombinációjával kezeltük a petesejteket. Mindkét csoport esetében szignifikánsan nagyobb ($P < 0,05$) pronukleusz-képződést (57,3–57,19 %) mutattak a petesejtek a többi kezeléshez (45,91–50,96 %) viszonyítva.

A kombinált kezelésre (SCX-csoport) azonban a petesejtek nagyobb része reagált érzékenyebben (degenerálódott), mint az egyéb kombináció nélkül alkalmazott cikloheximid-kezelésre; ez a különbség statisztikailag igazolható ($P < 0,05$) volt. Eredményeink hasonlóak Lee (2005) megállapításaival; 10 µg/ml CX és citohalazin-B kombinációjának alkalmazásakor 46,6 %-os aktiválódást figyelt meg.

A 6-DMAP protein szerin/treonin kináz gátló vegyület. Egér és szarvasmarha petesejtekkel folytatott kutatások rávilágítottak aktiválódást indukáló és pronukleusz-képződést gyorsító hatására (Moses – Masui, 1994). Grupen (2002) elektromos aktiválással kombinálva az 5, illetve 2 mM koncentrációban alkalmazott 6-DMAP-kezelést, 47 %-os blasztociszta-arányról számolt be sertés esetében. Kísérleteinkben a 6-DMAP-t 2 mM koncentrációban alkalmaztuk (D-csoport), illetve stroncium-kloriddal kombináltuk (15,85 mg/ml SrCl_2 + 32,36 mg/ml 6-DMAP). Mindkét kezelés hatására a petesejtek több mint 45 %-a aktiválódott, illetve az aktiválódott petesejtek szintén több mint 45 %-a megkezdte az embrionális fejlődést.

A vizsgálatok eredményei alapján azonban elmondható, hogy az embriófejlődés határfoka a 6-DMAP-val kezelt petesejtek esetében volt a legrosszabb; a D-és az SD-csoportokban blasztociszta embriókat nem tudtunk megfigyelni, az embriófejlődés morula állapotig jutott az IVC 6. napján.

Egér, patkány és szarvasmarha petesejtek sikeres aktiválásáról stroncium-kloriddal több kutatócsoport is beszámolt (Roh – Hwang, 2002; Meo et al., 2004). Krivokharchenko (2002) 2 mM, Lei (2002) 10 mM koncentrációban alkalmazott stroncium-kloriddal sikeresen aktivált patkány petesejteket. Okada (2003) stroncium-klorid sertés petesejtek citoplazmájába injektálásával 64 %-os pronukleusz-képződést ért el.

Meo (2004) szarvasmarha petesejteket aktivált 10 mM stroncium-kloriddal, 5 órás kezelést követően. 26,6–53,3 %-os pronukleusz-képződésről, és 6,3 %-os blasztociszta-arányról számolt be.

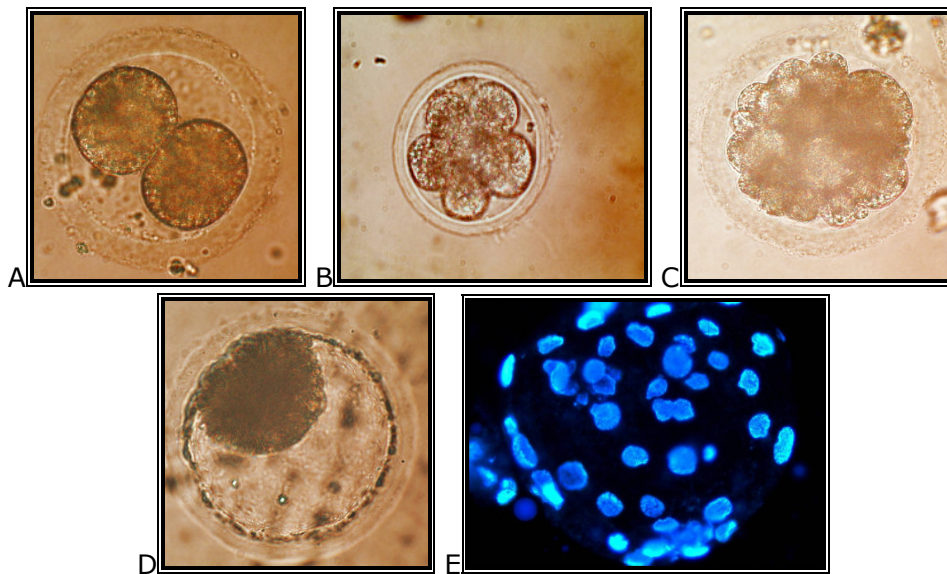
Vizsgálatainkban a Meo által alkalmazott koncentrációt, és kezelési időt alkalmazva aktiváltunk sertés IVM-petesejteket.

Az S-csoportban 50,96 %-os pronukleusz-képződést, és 13,24 %-os blasztociszta-arányt jegyeztünk fel.

Kísérleteinkben ezen kívül megvizsgáltuk a stroncium-klorid és cikloheximid, illetve 6-DMAP kombinációk aktiválódásra és embriófejlődésre gyakorolt hatását is.

Eredményeink alapján úgy tűnik, hogy az általunk vizsgált vegyszerek közül a stroncium-klorid és a cikloheximid kombinációja (SCX) a legalkalmasabb sertés petesejtek aktiválására. Szintén az SCX-csoportban figyeltük meg a legnagyobb blasztociszta-arányt is (25,93 %).

Ugyanakkor, további összehasonlító vizsgálatokra lenne szükség arra nézve, hogy a petesejtek szerkezetét és későbbi fejlődőképességét az alkalmazott fehérjeszintézist gátló vegyületek milyen módon befolyásolják.



13. kép: 2-sejtes embrió (A), 6–8-sejtes embrió (B), morula (C), blasztociszta (D, E) [Saját felvétel]

4.2. Sertés petesejtek krioprezervációja

4.2.1. Eredmények

1. kísérletsorozat eredményei

A vizsgálat során *in vitro* maturáltatott (M-II), kumuluszsejtekkel körülvett (K-csoport) és a maturáció után pipettázással lecsupasztott (CS-csoport) petesejteket vitrifikáltunk OPS eljárással.

Ismétlésenként 25 petesejtet (n=75) fixáltunk és 0,1 %-os ecetsavas-orceinnel festettünk, majd meghatároztuk a sejtmag érését (M-II petesejtek arányát), illetve a kumuluszsejtek expandálódása alapján az expandálódási rátát. Eredményeinket a 9. táblázat szemlélteti.

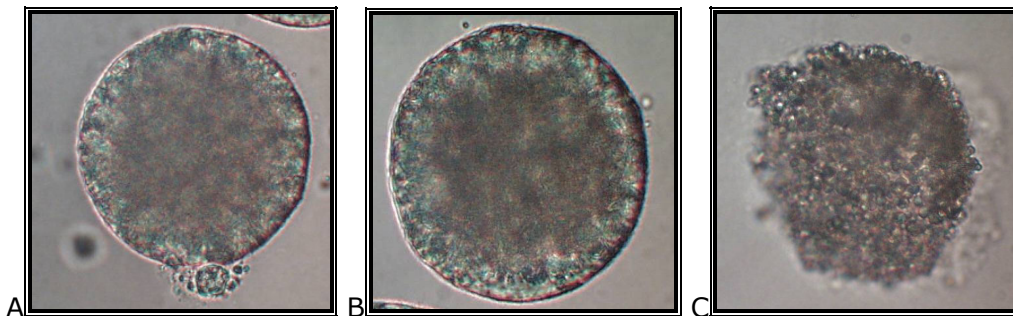
9. táblázat: A vizsgált petesejtek *in vitro* maturációjának eredményességét jelző mutatók

Petesejtek száma	Sejtmagi érés db (%±SEM)	Expandálódási ráta db (%±SEM)
n=75	62 (82,67±6,11)	67 (89,33±6,11)

A CS-csoportban (78,08±1,88 %) a petesejtek szignifikánsan (P<0,05) nagyobb hányada degenerálódott a vitrifikációs eljárás során, mint a K-csoportban (57,04±1,55 %).

A K-csoportban (218,73 sec) és a CS-csoportban (83,07 sec) a petesejtek zona pellucidája szignifikánsan (P<0,05) rövidebb idő alatt bomlott le 0,1 % pronáz hatására, mint a kontroll csoportban (255,24 sec).

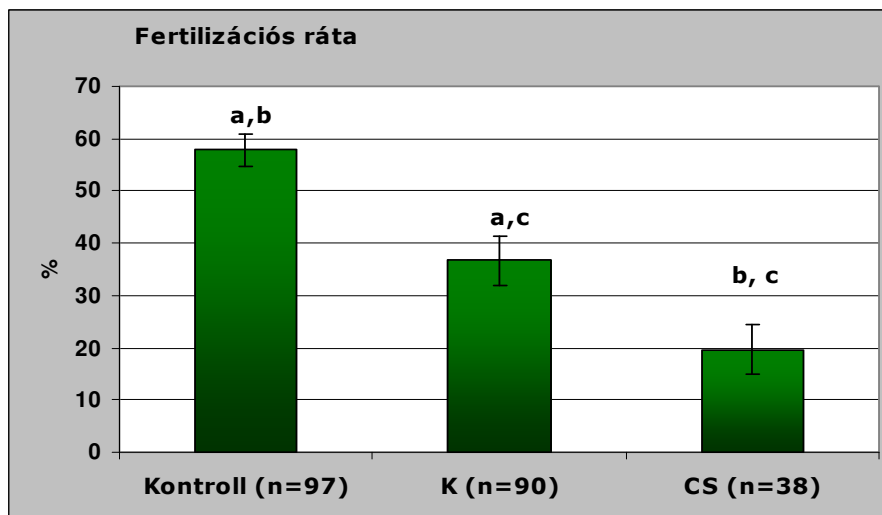
A K-csoportban (218,73 sec) a ZP szignifikánsan hosszabb idő alatt bomlott le, mint a CS-csoportban (83,07 sec).



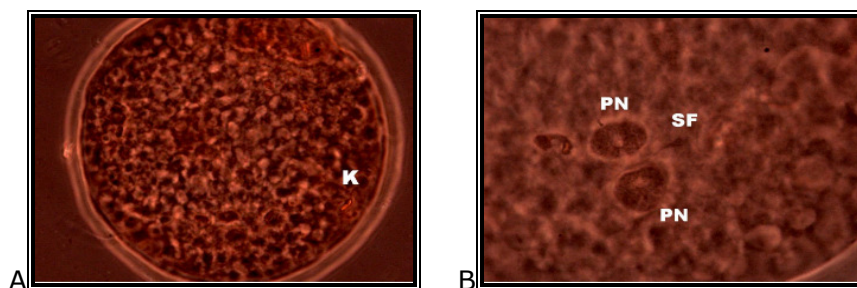
14. kép: Sertés fagyasztott/visszaolvasztott petesejtek a ZP eltávolítása után: petesejt intakt plazmamembránnal, látható sarkitesttel (A), petesejt ép plazmamembránnal (B), feloldódott plazmamembrán, degenerálódott petesejt (C). [Saját felvétel]

A kontroll csoportban ($93,33 \pm 6,67$ %) szignifikánsan ($P < 0,05$) nagyobb arányban rendelkeztek a petesejtek intakt plazmamembránnal, mint a K-csoportban ($68,89 \pm 10,18$ %) és a CS-csoportban ($60 \pm 6,67$ %).

A fagyasztott/visszaolvasztott petesejtek szignifikánsan ($P < 0,05$) kisebb hányada (K-csoport: $36,63 \pm 4,64$ %; CS-csoport: $19,66 \pm 4,78$ %) termékenyült, a kontroll csoporthoz képest ($57,89 \pm 3,13$ %). Ugyanakkor szignifikáns különbség mutatható ki a K-csoport ($36,63 \pm 4,64$ %) és a CS-csoport ($19,66 \pm 4,78$ %) fertilizációs rátája között is (3. ábra).



3. ábra: Termékenyülési arány a különböző csoportokban. ^{a,b,c} Az oszlopok közötti szignifikáns ($P < 0,05$) különbséget jelölik.



15. kép: Termékenyült sertés petesejtek: kompakt spermium-kromatin [K] az ooplazmában (A); 2 pronukleusszal [PN: pronukleusz; SF: spermium farok] (B) [Saját felvétel]

2. kísérletsorozat eredményei

Kísérletünkben *in vitro* maturáltatott, kumuluszsejtekkel körülvett (MK-csoport) és éretlen, lecsupaszított (GCS-csoport), illetve éretlen, kumuluszsejtekkel körülvett (GK-csoport) petesejteket fagyasztottunk az OPS vitrifikációs eljárással.

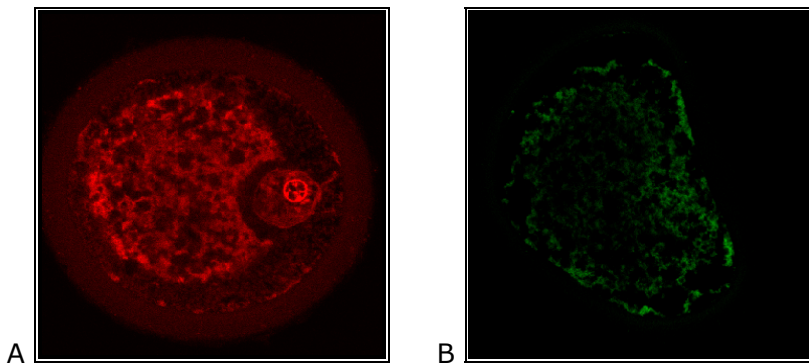
A kontroll csoportban a petesejteket maturáltattuk (42 h), majd termékenyítettük – esetükben vitrifikációs hűtést nem alkalmaztunk.

Az éretlen petesejtek fagyasztást/visszaolvasztást követő maturációjakor szignifikánsan ($P < 0,05$) kevesebb petesejtben figyeltünk meg M-II osztódási stádiumot a kontroll csoporthoz viszonyítva (10. táblázat).

10. táblázat: A sejtmag érésének alakulása a vitrifikációs eljárást követő IVM során. ^{a,b} A sorok közötti szignifikáns különbséget jelentik ($P < 0,05$).

Csoportok	Sejtmag érése db (% \pm SEM)
Kontroll	58 (77,33 \pm 2,31) ^{a,b}
GK-csoport	5 (16,70 \pm 3,61) ^a
GCS-csoport	3 (10,83 \pm 1,44) ^b

A visszaolvasztást követően a GK-csoporthoz (78,57 \pm 2,04 %) és a GCS-csoporthoz (85,71 \pm 1,31 %) képest az MK-csoportban (62,5 \pm 3,63 %) szignifikánsan ($P < 0,05$) kisebb arányban degenerálódtak a petesejtek a vitrifikációs eljárás során – ugyanakkor szintén szignifikáns ($P < 0,05$) különbség volt a GK-és a GCS-csoportok között is.



16. kép: GV-I petesejt a fagyasztás/visszaolvasztást követően [festés propidium-jodiddal] (A); a vitrifikációs eljárás során degenerálódott petesejt [FITC-PNA fluoreszcensz festés](B)[Saját felvétel]

A kontroll csoportban, a többi csoporthoz képest nagyobb arányban termékenyültek a petesejtek, illetve az MK-csoportban szintén nagyobb volt a fertilizációs ráta, mint a GK-és a GCS-csoportokban (11. táblázat).

11. táblázat: Termékenyülési arány az egyes csoportokban. ^{a,b,c} A sorok közötti szignifikáns ($P < 0,05$) különbségeket jelölik.

Csoportok	Fertilizációs ráta db (% \pm SEM)
Kontroll	67 (51,83 \pm 3,55) ^a
GK-csoport	8 (13,33 \pm 2,89) ^{a,b}
GCS-csoport	4 (9,4 \pm 0,96) ^{a,c}
MK-csoport	27 (35,73 \pm 2,15) ^{a,b,c}

4.2.2. Eredmények értékelése, következtetések

Sertés gaméták és embriók hűtéssel szembeni rendkívüli érzékenysége korlátozza az alkalmazható hűtési eljárásokat; esetükben a hagyományos hűtési eljárások alacsony hatásfokúak; a megoldást a vitrifikációs technikák alkalmazása jelentheti (Dobrinsky, 1997).

Kísérleteinkben a nyitott végű műszalma (OPS) vitrifikációs eljárást alkalmaztuk a petesejtek fagyasztására.

Két kísérletsorozatban, összesen 2237 petesejtet vizsgáltunk meg.

1. kísérletsorozat

A kumuluszállomány szerepét a petesejtek fejlődésében több kutatócsoport is megerősítette. A kumuluszsejtek segítik a sejtmag és a citoplazma érését, ezáltal szerepet játszanak a hím előmag képződésében, a monospermiás termékenyülésben és a korai embrionális fejlődésben is (Nagai et al., 1994).

A kumuluszsejtek az ovulációt követően több kontroll mechanizmusban vesznek részt, melyek irányítják a spermium petesejtbe hatolását (Carell et al., 1993), illetve a termékenyülés során szelektálják a morfológiailag abnormális és a nem kapacitálódott spermiumokat (Cherr et al., 1986).

Vizsgálatainkban arra kerestük a választ, hogy a kumuluszsejtek segítő hatása a vitrifikációs eljárás során is érvényesül-e.

In vitro maturáltatott, kumulusz-petesejt komplexeket (K-csoport), illetve a maturációt követően, pipettázással lecsupaszított petesejteket (CS-csoport) fagyasztottunk, majd a visszaolvasztást követően össze-

hasonlítottuk a két csoportban a petesejtben bekövetkezett változásokat, és a termékenyülési rátát.

A hűtési eljárás során a petesejtben csökkenhet a plazmamembrán szelektív permeabilitása, megváltozhat a meiotikus orsó mikrofilamentumainak, mikrotubulusainak a szerkezete, sérülhetnek a sejtkapcsoló struktúrák, a membránok depolimerizálódhatnak, (Johnson – Pickering, 1987; Aman – Parks, 1994; Diez et al., 2005).

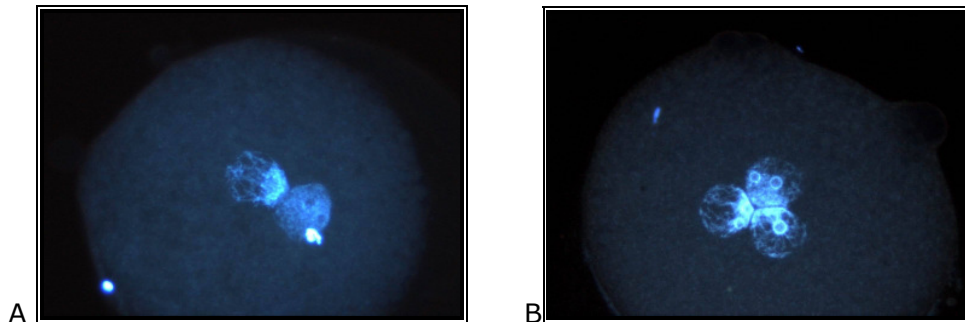
Napjainkban még nem született egységes vélemény azzal kapcsolatban, hogy a vitrifikáció során szükség van-e a kumuluszsejtek jelenlétére a petesejt körül (Modina et al., 2004).

Fujihara (2005) szerint különbség van a csupasz és a kumuluszsejtekkel körülvett petesejtek krioprotektív anyagokkal szembeni permeabilitása között.

Több, korábbi tanulmány számolt be arról, hogy a csírahólyag (GV)–stádiumú petesejtek sokkal érzékenyebben reagálnak a hűtésre, mint a M-II állapotú oociták. Rojas (2004) szerint ennek az az oka, hogy a még nem maturálódott oociták és a kumuluszsejtek között szoros kapcsolat áll fenn, azonban a vitrifikáció során ezek a sejtkapcsoló struktúrák sérülhetnek, ami a petesejtek csökkentett életképességében nyilvánulhat meg.

A kapott eredmények szerint a kumuluszsejtekkel körülvett petesejtek szignifikánsan kisebb része degenerálódott a vitrifikáció során, mint azok a petesejtek, melyek kumuluszállományát a vitrifikációt megelőzően eltávolítottuk. Kísérleteinkben a kumuluszsejtekkel körülvett oociták (COC-k) jobban tolerálták a hűtés során fellépő károsodásokat.

A visszaolvasztást/termékenyítést követően magasabb termékenyülési arányt tapasztaltunk a kumuluszsejtekkel körülvett oociták csoportjában, mint a kumuluszsejtek nélkül fagyasztott petesejtek esetében.



17. kép: Termékenyült petesejt 2 pronukleusszal (A); 3 pronukleusszal – polispermiás termékenyülés (B) [Saját felvétel]

2. kísérletsorozat

Megvizsgáltuk, hogy az éretlen (GV) és az *in vitro* maturáltatott (M-II), vitrifikált petesejtek visszaolvasztást követő élet- és fejlődőképessége hogyan alakult.

Napjainkig a legtöbb petesejt–vitrifikációs kutatás az érett oocitákra fókuszált. Ismert azonban, hogy a M-II petesejtek meiotikus orsója – a gazdasági állatok többségében – rendkívül érzékenyen reagál az alacsony hőmérsékletre (Aman – Park, 1994), ugyanakkor a meiotikus orsó sérülése következtében gyakori a kromoszómák, mikrofilamentumok és a kortikális granulumok szerkezetének irreverzibilis megváltozása is (Rojas et al., 2004).

Kísérleteink eredményei alátámasztják azt az állítást, miszerint a GV-stádiumú petesejtek reagálnak a legnagyobb érzékenységgel – eddig nem teljesen tisztázott okokból – a hűtési eljárásokra (Nagashima et al., 1995). Lehetséges okként említik a csírahólyag szerkezetének irreverzibilis megváltozását, és a kumuluszsejtekkel kapcsolódó struktúrák (gap junction-ok) sérüléseit.

Pedro (1996) szerint a szarvasmarha GV-állapotú petesejtek kevésbé permeábilisak az etilén-glikollal szemben, ami szintén az alacsony túlélési arány okozója lehet.

Didion (1990) szerint a GV-stádiumú sertés petesejtek nem élnek túl a +15°C alatti hőmérsékletre hűtést.

Kísérleteinkben nagy degenerálódási arányt jegyeztünk fel a GV-állapotú petesejtek esetében, ugyanakkor az oociták 15–20 %-a normális morfológiát mutatott a visszaolvasztást követően.

Eredményeink alapján úgy tűnik, hogy az éretlen petesejtek érzékenyebben reagálnak a vitrifikációra, mint az *in vitro* maturáltatott oociták. Különösen a kumuluszsejtek nélküli, éretlen petesejtek mutattak nagy degenerálódási arányt a vitrifikáció hatására.

Összefoglalásképpen elmondható, hogy a vitrifikációs eljárás a kumuluszsejtekkel körülvett, *in vitro* maturáltatott (M-II) petesejtek esetében volt a leghatékonyabb.

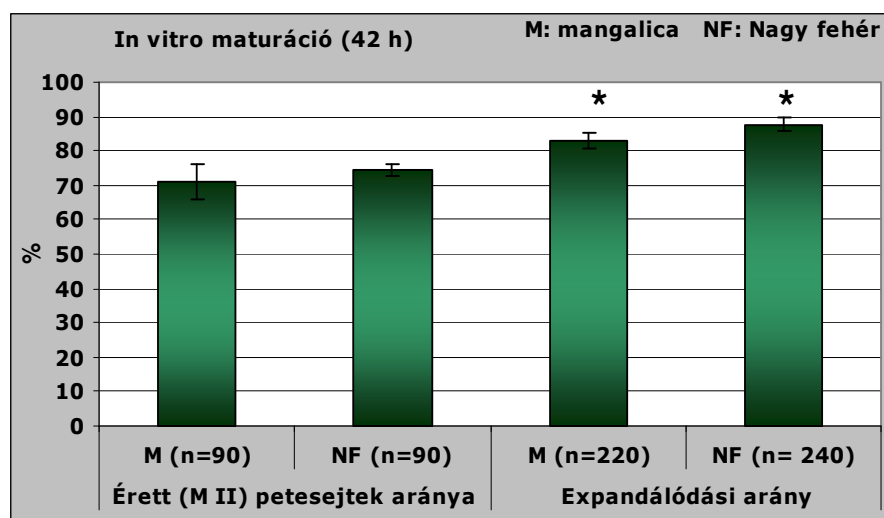
4.3. Mangalica petesejtek maturálata és krioprezervációja

4.3.1. Eredmények

1. kísérletsorozat eredményei

A 42 órás IVM során, a NF-csoportban ($87,63 \pm 2,13$ %) szignifikánsan ($P < 0,05$) nagyobb expandálódási arányt tapasztaltunk, mint a M-csoportban ($82,99 \pm 2,32$ %).

A sejtmag érésekor fellépő különbségek (M-csoport: $71,11 \pm 5,09$ %; NF-csoport: $74,44 \pm 1,92$ %) statisztikailag nem igazolhatók (4. ábra).

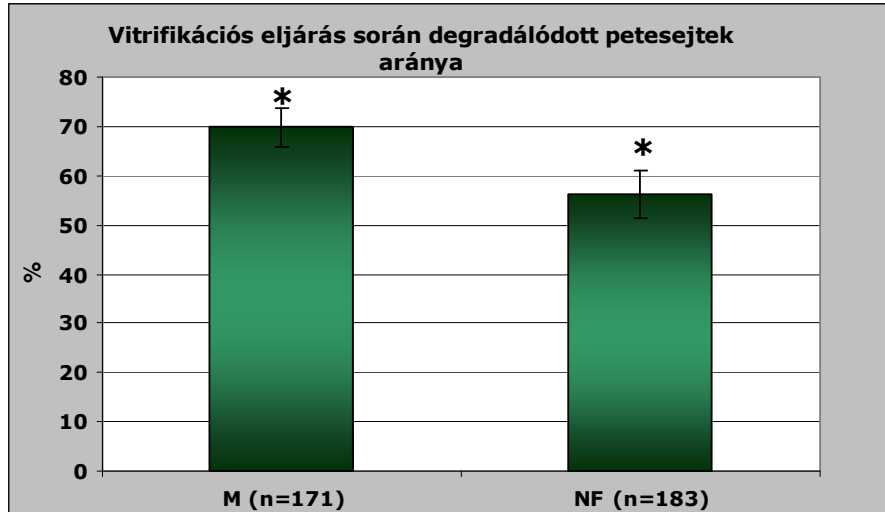


4. ábra: Mangalica és nagy fehér sertés petesejtek maturációjának összehasonlítása. Zárójelben a vizsgált petesejtek elemszáma (n) található.

* Az oszlopok közötti szignifikáns különbséget jelenti ($P < 0,05$).

2. kísérletsorozat eredményei

A NF-csoportban a petesejtek szignifikánsan ($P < 0,05$) kisebb hányada ($56,31 \pm 4,89$ %) degenerálódott a hűtés/visszaolvasztás során, mint az M-csoportban ($69,95 \pm 3,91$ %). Eredményeinket az 5. ábra szemlélteti.



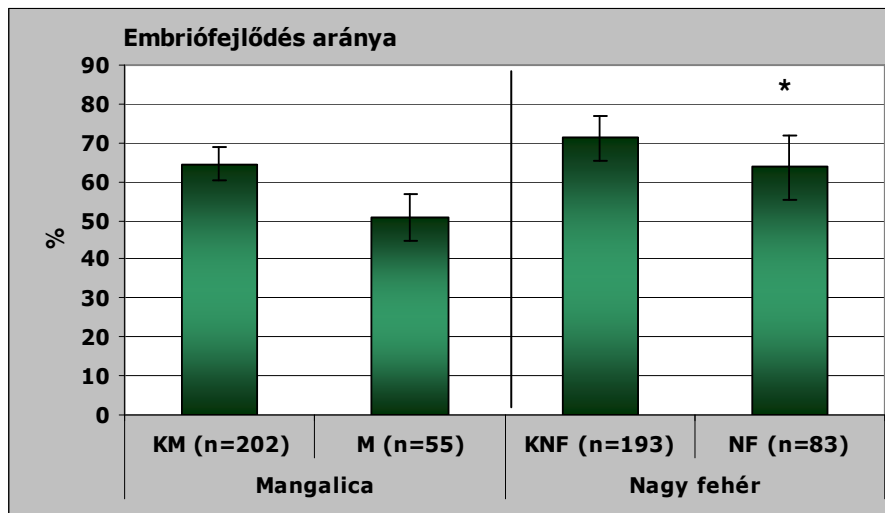
5. ábra: Mangalica és nagy fehér sertés petesejtek visszaolvasztást követő degenerálódásának aránya. Zárójelben a vizsgált petesejtek száma (n) található. * Az oszlopok közötti szignifikáns ($P < 0,05$) különbséget jelenti.

3. kísérletsorozat eredményei

A visszaolvasztott/termékenyített csoportok mindegyikében 50 %-nál nagyobb arányú embriófejlődést tapasztaltunk (M-csoport: $50,62 \pm 5,97$ %; NF-csoport: $63,77 \pm 8,29$ %).

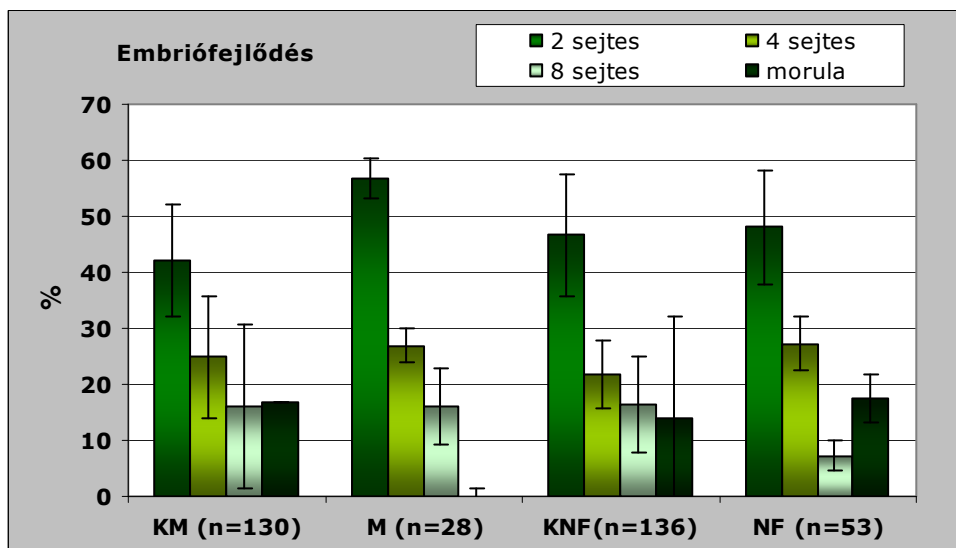
A kontroll csoportokban a termékenyített petesejtek több mint 60 %-a megkezdte az embrionális fejlődést (KM-csoport: $64,52 \pm 4,18$ %; KNF-csoport: $71,22 \pm 5,82$ %).

Az NF-csoportban szignifikánsan ($P < 0,05$) kisebb volt az embriófejlődést megkezdett sejtek aránya, mint a kontroll NF-csoportban (6. ábra).



6. ábra: Embriófejlődés aránya a különböző csoportokban. Zárójelben a vizsgált petesejtek/embriók száma (n) található. *Az oszlopok közötti szignifikáns ($P < 0,05$) különbséget jelenti.

A fagyasztott/visszaolvasztott, termékenyített petesejtek kultiválása során kapott eredményeinket a 7. ábra szemlélteti.



7. ábra: Embriófejlődés az egyes csoportokban az IVC 4. napján. Zárójelben a vizsgált embriók száma (n) található.

A csoportokban megfigyelt embriófejlődési stádiumok között szignifikáns különbséget ($P < 0,05$ és $P < 0,001$) nem tapasztaltunk.

Morula embriókat a mangalica esetében csak a kontroll csoportban tudtunk megfigyelni ($16,72 \pm 4,8$ %).

4.3.2. Eredmények értékelése, következtetések

Az embrió-előállításnak és a krioprezervációs eljárásoknak komoly szerepe lehet a kihalóban lévő állatfajok és fajták megmentésében, a biodiverzitás fenntartásában és növelésében, a génmegőrző munkában.

Az általunk alkalmazott maturációs rendszer alkalmasnak bizonyult a vágóhídi mangalica petefészkekből származó, éretlen mangalica petesejtek *in vitro* maturáltatására.

A sejtmag érését vizsgálva megállapítottuk, hogy a mangalica petesejtek IVM-ja sikeres volt; a mangalica oociták 42 óra alatt hasonló arányban maturálódtak, mint a nagy fehér sertés petesejtek.

A génmegőrzés fontos eszköze a gaméták/embriók fagyasztva tárolása, azonban sertés esetében a hagyományos hűtés határfoka rendkívül alacsony, ezért a lassú hűtési eljárásokkal szemben új módszerekre van szükség.

Sertés esetében – a hőmérséklet-változással kapcsolatos rendkívüli érzékenység ellenére – több kutatócsoport sikerrel alkalmazza a különböző vitrifikációs technikákat (Dinnyés et al., 2000; Somfai et al., 2006).

A vitrifikációs eljárások határfoka azonban különböző.

Dinnyés (2000) SSV eljárással fagyasztott/visszaolvasztott petesejteket termékenyített, és az IVC során 20 %-os blasztociszta arányt ért el.

Esaki (2004) sertés embriókat fagyasztott az MVC technikával, és 41 %-os embrió-túlélési arányról számolt be.

Rojas (2004) sertés petesejteket vitrifikált az OPS eljárással, és 14 %-os embriófejlődést tapasztalt.

A hűtés során fellépő károsodások csökkenthetők a különböző krioprotektív anyagok kombinálásával, többlépcsős ekvibráltatással a hűtés előtt; a petesejtek lipidtartalmának eltávolításával vagy polarizálásával, előhűtött oldatok használatával.

Vizsgálataink során ezért krioprotektív anyagként (CPA) etilén-glikolt és a dimetil-szulfoxidot használtunk, és a CPA-k növekvő koncentrációjára nézve, többlépcsős ekvibrációt alkalmaztunk.

Azt tapasztaltuk, hogy a petesejtek hűtéssel szembeni érzékenysége fajon belül is változó.

Mangalica petesejtek a nagy fehér petesejtekkel szemben kevésbé tolerálták a hűtési eljárás során bekövetkezett változásokat, ami a szignifikánsan nagyobb petesejt–degenerálódásban nyilvánult meg.

Állításunk megerősítésére további vizsgálatokra (mikrofilamentumok-, sejtorganellumok-, kromoszóma-vizsgálatok) van szükség.

A mangalica petesejtek esetében a visszaolvasztást követő embriófejlődés megtorpant 8–sejtes stádiumban, míg a nagy fehér embriók 14 %-a eljutott a szedercsíra állapotig a négy napos kultiválás során.

Ugyanakkor a kontroll csoportokban kevesebb, mint 1 % különbséget tapasztaltunk a morulák arányát tekintve a mangalica és a nagy fehér embriók között.

Ez is indokolja, hogy a különböző fajták esetében szükség lehet a vitrifikációs eljárások finomítására, az ekvibrációs idők, és az alkalmazott krioprotektív anyagok módosítására.

5. ÚJ, Tudományos Eredmények

5.1. Sertés petesejtek aktiválása

- Minden egyéb elő-kezelés nélkül alkalmazott stroncium-klorid, 6-dimetil-aminopurin, cikloheximid, illetve ezen vegyületek kombinációja alkalmas sertés petesejtek aktiválására, továbbá a stroncium-kloriddal, a cikloheximiddel és a stroncium-klorid + cikloheximid kombinációjával aktivált petesejtek képesek eljutni blasztociszta stádiumig (13,24 %, 18,95 % és 25,93 %).

5.2. Sertés petesejtek krioprezervációja

- Az *in vitro* maturáltatott, kumuluszsejtek nélkül fagyasztott oociták kevésbé tolerálják a hűtés során fellépő károsodásokat, és zona pellucidájuk is rövidebb idő alatt bomlik le 0,1 % pronáz hatására, továbbá termékenyülési arányuk is alacsonyabb, mint a szintén *in vitro* maturáltatott, kumuluszsejtekkel borított, fagyasztott petesejteké.
- A fagyasztott/visszaolvasztott petesejtek *in vitro* maturációjának határfoka szignifikánsan rosszabb, mint a közvetlen a kinyerés után maturáltatott petesejteké.
- A „nyitott végű műszalma” (OPS) vitrifikációs eljárás az *in vitro* maturáltatott kumulusz–petesejt komplexek esetében a leghatékonyabb.

5.3. Mangalica petesejtek maturáltatása és krioprezervációja

Mangalica petesejtek *in vitro* maturációjával és vitrifikációs hűtésével tudomásunk szerint még nem foglalkozott egy kutatócsoport sem. Kísérletünkkel kapcsolatos eredmények az alábbiakban foglalhatók össze:

- Vágóhídi petefészkekből származó, éretlen mangalica petesejtek 42 óra alatt sikeresen maturáltathatók *in vitro* körülmények között.
- Mangalica petesejtek a nagy fehér petesejtekkel szemben kevésbé tolerálják a hűtési eljárás során bekövetkezett változásokat, amit a szignifikánsan nagyobb petesejt degenerálódás, és a visszaolvasztást követő alacsonyabb termékenyülési arány jelez, ugyanakkor a „nyitott végű műszalma” (OPS) vitrifikációs eljárással fagyasztott mangalica petesejtek több mint 50 %-a megkezdte az embrionális fejlődést az *in vitro* termékenyítést követően.

6. JAVASLATOK

6.1. Sertés petesejtek aktiválása

Petesejtek aktiválása rendkívüli jelentőséggel bír a sejtmag-átültetési klónozás során.

Az aktiválás történhet a petesejtek elektromos stimulációjával és vegyszerezes kezeléssel, vagy ezek kombinációjával: lehetőség van széles spektrumú fehérjeszintézis gátlók alkalmazására, illetve etanol, stroncium-klorid és ionofor vegyületek használatára, melyek a petesejt plazmamembránját a Ca^{2+} -ionok számára reverzibilisen átjárhatóvá teszik, illetve a sejten belüli Ca^{2+} -raktárak stimulálásával emelik az ooplazma Ca^{2+} -tartalmát.

Az elektromos aktiváláshoz azonban speciális és drága műszerek szükségesek, így célunk egy megbízható és olcsó kémiai aktiválási rendszer kidolgozása volt.

Eredményeink mutatják, hogy az alkalmazott vegyületek (stroncium-klorid, cikloheximid, 6-dimetil-aminopurin és ezek kombinációi) képesek kiváltani *in vitro* maturált sertés petesejtek aktiválódását.

A vizsgálatok során alkalmazott vegyszerek közül a stroncium-klorid és a cikloheximid kombinációjával értük el a legnagyobb blasztociszta arányt. A stroncium-klorid által megemelt Ca^{2+} -szint inaktíválta a citosztatikus faktort (CSF), a cikloheximid pedig a CSF újratemelődésének gátlásával csökkentette az MPF aktivitását.

Az elektromos aktiválással nagyobb arányú aktiválódás érhető el, azonban egyszerűsége, olcsósága, és minimális eszközigénye miatt a dolgozatban bemutatott kémiai módszer alkalmazását javasoljuk sertés petesejtek aktiválására.

6.2. Sertés petesejtek krioprezervációja

1. kísérletsorozat

Napjainkban még nem született egységes vélemény azzal kapcsolatban, hogy a vitrifikáció során szükség van-e a kumuluszsejtek jelenlétére a petesejt körül, vagy nincs (Modina et al., 2004).

Megállapítottuk, hogy az expandált kumuluszállománnyal rendelkező petesejtek jobban tolerálják a hűtés során fellépő károsodásokat és a visszaolvasztást követően magasabb termékenyülési arányt mutatnak, mint a kumuluszsejtek nélkül fagyasztott/visszaolvasztott petesejtek.

Eredményeink alapján sertés petesejtek „nyitott végű műszalma” (OPS) vitrifikációjakor *in vitro* maturáltatott kumulusz–petesejt komplexek (COC-k) használatát ajánljuk.

2. kísérletsorozat

Napjainkig a legtöbb petesejt–vitrifikációs kutatás az érett (metafázis-II) oocitákra fókuszált. Azonban ismert, hogy a M-II állapotú petesejtek meiotikus orsója – a gazdasági állatok többségében – rendkívül érzékenyen reagál az alacsony hőmérsékletre.

Kísérletünkben megvizsgáltuk, hogy a csírahólyag [GV] és metafázis-II állapotban vitrifikált petesejtek visszaolvasztást követő élet- és fejlődőképessége hogyan alakult.

A GV-stádiumú petesejtek fagyasztásakor szignifikánsan magasabb petesejt–degenerálódást és alacsonyabb termékenyülési arányt figyeltünk meg, mint a M-II petesejtek esetében. Valószínű, hogy a csírahólyag állapotú petesejtek kevésbé permeábilisak az etilén-glikollal szemben, így a krioprotektív anyag nem tudja kifejteni védő hatását az eljárás során.

Az eredmények alapján – a meiotikus orsó érzékenysége ellenére – sertés petesejtek vitrifikációs hűtésekor *in vitro* maturáltatott (M-II) petesejtek használata javasolt.

6.3. Mangalica petesejtek maturáltatása és krioprezervációja

Megvizsgáltuk, hogy a mangalica petesejtek milyen hatékonysággal használhatók az *in vitro* maturációs rendszerben.

Eredményeink alapján elmondható, hogy a nagy fehér petesejteknél alkalmazott maturációs protokoll sikeresen adaptálható mangalica petesejtek számára.

A mangalica petesejtek OPS vitrifikációs eljárással szembeni nagyfokú érzékenysége miatt javasoljuk a vitrifikációs eljárás módosítását. Úgy véljük, hogy a petesejtek hűtéssel szembeni érzékenysége nemcsak fajok között, hanem fajon belül is változó.

Állításunk megerősítésére azonban további vizsgálatokra (sejtorganellumok, mikrofilamentumok szerkezetének elemzése, kromoszóma–vizsgálatok) van szükség.

7. ÖSSZEFOGLALÁS

Az alkalmazott biotechnológiai eljárások többségének alapját a laboratóriumi körülmények között előállított embriók adják, ami jól működő *in vitro* embrió-előállító rendszer (IVP) meglétét feltételezi.

Az elmúlt évtizedekben számos új eljárás került kidolgozásra az IVP-rendszer fejlesztésével kapcsolatban, azonban ezen a területen a jövőben további kutatások szükségesek.

Kísérleteinket három különböző – ugyanakkor alapjaiban összekapcsolódó – témában végeztük el.

Első vizsgálatunk célja sertés petesejtek kémiai úton, vegyszerekkel történő aktiválásának kiváltása, illetve az alkalmazott kemikáliák embriófejlődésre gyakorolt hatásának vizsgálata volt.

Három kísérletsorozatban összesen 2401 petesejtet vizsgáltunk meg.

Kísérleteinkben *in vitro* maturált sertés petesejteket kezeltünk 5 órán keresztül különböző vegyszerekkel (10 mM stroncium-kloriddal; 0,04 mM cikloheximiddel, 2 mM 6-dimetil-aminopurinnal, illetve ezek kombinációival).

Egyes kutatók szerint a cikloheximid önmagában nem képes kiváltani sertés petesejtek aktiválódását (Nussbaum – Prather, 1995). Vizsgálataink során azonban azt tapasztaltuk, hogy a 0,04 mM koncentrációban alkalmazott cikloheximid – egyéb elő-kezelés nélkül – elindítja a sertés petesejtek aktiválódását, és az ily módon aktivált petesejtek eljutnak a blasztociszta stádiumig (18,95 %).

Eredményeink alapján a stroncium-klorid és a cikloheximid kombinációja tűnik a legalkalmasabbnak – az általunk vizsgált vegyszerek közül – sertés petesejtek aktiválódásának kiváltására.

Szintén ebben a csoportban figyeltük meg a legnagyobb blasztociszta-arányt is (25,93 %).

Az általunk elért aktivációs ráta hasonló képet mutat más kutatócsoportok kémiai úton történő aktiválási eredményeivel (Meo et al., 2004; Yi – Park, 2005).

Második kísérletünkben a tíz évvel ezelőtt bemutatott (Vajta et al., 1997) „nyitott végű műszalma” (OPS) vitrifikációs eljárást alkalmaztuk sertés petesejtek fagyasztására.

Két kísérletsorozatban, összesen 2237 petesejtet vizsgáltunk meg.

Az első kísérletsorozatban értékeltük, hogy a kumuluszsejteknek milyen hatása van az *in vitro* maturált sertés petesejtek fagyasztást/visszaolvasztást követő élet- és fejlődőképességére, illetve termékenyülésére.

A vizsgálat során *in vitro* maturáltatott, kumulusz–petesejt komplexeket, illetve a maturáció után pipettázással lecsupasztott petesejteket vitrifikáltunk, majd összehasonlítottuk a két csoportban a visszaolvasztást követően, a petesejtben bekövetkezett változásokat, és a termékenyülési rátát.

Napjainkban még nem született egységes vélemény azzal kapcsolatban, hogy a vitrifikáció során szükség van-e a kumuluszsejtek jelenlétére a petesejt körül (Modina et al., 2004; Fujihara et al., 2005).

Eredményeink jelzik, hogy a kumuluszsejtekkel körülvett petesejtek szignifikánsan kisebb része degenerálódott a vitrifikáció során, mint a kumuluszsejtek nélkül fagyasztott petesejtek.

Az expandált kumuluszállománnyal rendelkező petesejtek jobban tolerálták a hűtés során fellépő károsodásokat, amit az alacsonyabb degenerálódási és a magasabb termékenyülési ráta mutat.

A második kísérletsorozatban megvizsgáltuk, hogy az éretlen (GV) és az *in vitro* maturáltatott (M-II) petesejtek hűtése milyen módon befolyásolja az oociták OPS vitrifikációs–eljárással szembei érzékenységet.

Napjainkig a legtöbb petesejt–vitrifikációs kutatás az érett (M-II) oocitákra fókuszált. Azonban ismert, hogy a M-II stádiumú petesejtek meiotikus orsója – a gazdasági állatok többségében – rendkívül érzékenyen reagál az alacsony hőmérsékletre (Aman – Park, 1994), ugyanakkor a meiotikus orsó sérülése következtében gyakori a kromoszómák, mikrofilamentumok és a kortikális granulomok szerkezetének irreverzibilis megváltozása is (Rojas et al., 2004).

Kísérleteink eredményei alátámasztják azt az állítást, miszerint az éretlen petesejtek reagálnak a legnagyobb érzékenységgel – eddig nem teljesen tisztázott okokból – a hűtési eljárásokra (Nagashima et al., 1995). Lehetséges okként említik a germinális vezikulum (csírahólyag) szerkezetének irreverzibilis megváltozását és a kumuluszsejtekkel kapcsolódó struktúrák (gap junction-ok) sérüléseit.

Pedro (1996) szerint a szarvasmarha GV–stádiumú petesejtek kevésbé permeábilisak az etilén-glikollal szemben, ami szintén az alacsony túlélési arány okozója lehet.

Munkánk során azt tapasztaltuk, hogy az éretlen petesejtek érzékenyebben reagáltak a vitrifikációra, mint az *in vitro* maturáltatott oociták. Különösen nagy arányban degenerálódtak a kumuluszsejtek nélküli, GV-állapotú petesejtek a vitrifikációs eljárás során.

Összefoglalásképpen elmondható, hogy az OPS vitrifikációs eljárás a kumuluszsejtekkel körülvett, M-II állapotú petesejtek esetében volt a leghatékonyabb.

Harmadik kísérletcsoportunk mangalica petesejtek *in vitro* maturációjára és a petesejtek krioprezervációjára irányult.

3 kísérletsorozatban összesen 658 mangalica és 676 nagy fehér sertés petesejtet vizsgáltunk.

Vágóhídi petefészkekből származó mangalica petesejteket maturáltattunk *in vitro* körülmények között.

Megvizsgáltuk, hogy a mangalica oociták milyen hatékonysággal használhatók az *in vitro* maturációs rendszerben. Eredményeink alapján elmondható, hogy a mangalica petesejtek sikeresen maturáltathatók laboratóriumi körülmények között.

A kísérletsorozat második részében *in vitro* maturáltatott mangalica és nagy fehér fajtacsoportba tartozó sertés petesejteket fagyasztottunk a „nyitott végű műszalma” vitrifikációs eljárással.

Értékeljük, hogy a mangalica petesejtek hűtéssel szembeni toleranciája a nagy fehér petesejtekhez képest hogyan alakul, illetve a visszaolvasztást követő *in vitro* termékenyítés segítségével sikeres embriófejlődés indukálható-e a mangalica esetében. A visszaolvasztást/termékenyítést követően meghatároztuk az eljárás során degenerálódott petesejtek arányát, továbbá megvizsgáltuk, hogy az embriófejlődést a sejtek mekkora része kezdte meg.

A kapott eredmények mutatják, hogy a mangalica petesejtek érzékenyebben reagáltak a hőmérsékletváltozásra, mint a nagy fehér petesejtek; ez alapján úgy véljük, hogy az oociták hűtéssel szembeni érzékenysége nemcsak fajok között, hanem fajon belül is változó.

Mangalica petesejtek a nagy fehér oocitákkal szemben kevésbé tolerálták a hűtési eljárás során bekövetkezett változásokat, ami a szignifikánsan nagyobb petesejt-degenerálódásban nyilvánult meg.

Állításunk megerősítésére azonban további vizsgálatokra (sejtorganellumok, mikrofilamentumok szerkezetének elemzése, kromoszóma-vizsgálatok) van szükség.

A kapott eredmények jelzik, hogy a különböző fajták esetében szükség lehet a vitrifikációs eljárások finomítására, az ekvibrációs idő, és az alkalmazott krioprotektív anyagok módosítására.

8. MELLÉKLETEK

1. melléklet

Petesejtek gyűjtéséhez használt oldat összetétele: TL-Hepes–PVA oldat

Megnevezés	Mennyiség g/500 ml	Katalógusszám
CaCl ₂ × 2H ₂ O	0,1470	C–7902
Gentamicin	0,0125	G–1272
Hepes	1,1915	H–3375
KCl	0,1193	P–5405
MgCl ₂ × 6 H ₂ O	0,0508	M–2393
NaCl	3,3316	S–5886
NaHCO ₃	0,0840	S–5761
NaH ₂ PO ₄	0,0204	S–5011
Na-piruvát	0,0110	P–2256
Penicillin	0,0325	P–3539
PVA	0,5000	P–8136
Szorbitol	1,0930	S–1876
Na-laktát	0,7 ml	L–4263

2. a melléklet

Az *in vitro* maturáció során alkalmazott alapoldat: TCM-199

Megnevezés	Mennyiség g/100ml	Katalógusszám
D-glükóz	0,0550	G-6152
M-199	0,9900	M-7528
NaHCO ₃	0,2200	S-5761
Na-piruvát	0,0100	P-2256
Penicillin	0,0065	P-3539
PVA	0,0100	P-8136

2. b melléklet

A maturáció első 20 órájában alkalmazott oldat

Megnevezés	TCM-199	Katalógusszám
Ciszteamin	100 µM	M-9768
hCG	10 IU/ml	Werft-Chemie Gmbh
L-glutamin	0,25 mM	G-8540
Na-piruvát	0,90 mM	P-2256
PMSG	10 IU/ml	Werft-Chemie Gmbh
Sertés follikuluszolyadék	10 %	*
Sztreptomycin-szulfát	0,1 mg/ml	S-6501

* A sertés follikuluszolyadékot 3–6 mm átmérőjű tűszőkből kézfecskendő segítségével nyertük ki, majd 3000g/perc fordulatszámon, 1 órán keresztül centrifugáltuk. Ezt követően szűrtük (22 µ), és a felhasználásig fagyasztószekrényben tároltuk.

2. c melléklet

A maturáció második felében (20–42h) alkalmazott oldat

Megnevezés	TCM-199	Katalógusszám
Ciszteamin	100 µM	M-9768
L-glutamin	0,25 mM	G-8540
Na-piruvát	0,90 mM	P-2256
Sertés folliculusfolyadék	10 %	*
Sztreptomicin-szulfát	0,1 mg/ml	S-6501

* A sertés folliculusfolyadékot a 2. b mellékletben leírt módon nyertük ki.

3. melléklet

Aktiváláshoz használt alapoldat: Ca²⁺-mentes, piruvát–laktát–NCSU-37 oldat (Kikuchi et al., 2002)

Megnevezés	Mennyiség (mM/l)	Katalógusszám
D-glükóz	5,55	G-6152
D-szorbitol	12,00	S-1876
Glutamin	1,00	G-8540
KCl	4,78	P-5405
KH ₂ PO ₄	1,19	P-5655
MgSO ₄	1,19	M-7774
NaCl	108,73	S-5886
NaHCO ₃	25,07	S-5761
Na-laktát	2,73 mM	L-4263
Na-piruvát	0,17 mM	P-2256
Penicillin	0,0065 g/100ml	P-3539
Sterptomycin-szulfát	0,005 g/100ml	S-6501

4. melléklet

A különböző vegyszerekkel történő kezelések során alkalmazott oldatok.

Az alapoldat Ca^{2+} -mentes (piruváttal, laktáttal kiegészített) NCSU-37 oldat volt (3. melléklet)

Kezelési csoportok	Kiegészítés		
	Megnevezése	Mennyisége	Katalógusszám
S-csoport	Stroncium-klorid	10 mM	255521
D-csoport	6-DMAP	2 mM	D-2629
CX-csoport	Cikloheximid	0,04 mM	C-7698
SD-csoport	Stroncium-klorid	15,85 mg/ml	255521
	6-DMAP	32,36 mg/ml	D-2629
SCX-csoport	Stroncium-klorid	15,85 mg/ml	255521
	Cikloheximid	1 mg/ml	C-7698

5. melléklet

Embriótenyésztéshez használt oldat: NCSU-37 összetétele

Megnevezés	Mennyiség (mM/l)	Katalógusszám
CaCl ₂ × 7H ₂ O	1,70	C-7902
D-szorbitol	12,00	S-1876
Glutamin	1,00	G-8540
Glükóz	5,55	G-6152
KCl	4,78	P-5405
KH ₂ PO ₄	1,19	P-5655
MgSO ₄ × 7H ₂ O	1,19	M-7774
NaCl	108,73	S-5886
NaHCO ₃	25,07	S-5761
Na-piruvát	0,17	P-2256
Na-laktát	2,73	L-4263
BSA	3 mg/ml	A-9418
Penicillin	0,0065 g/100ml	P-3539
Szterptomycin-szulfát	0,005 g/100ml	S-6501

6. melléklet

Fagyasztás előtti ekvilibráció során használt oldatok összetétele

a, Alapoldat (HM)

Kiegészítés	Hepes–TCM-199-oldat (M–7528)	Katalógusszám
BSA	5 mg/ml	A–9418

b, Az első ekvilibrációhoz használt médium (V1)

Kiegészítés	Hepes–TCM-199-oldat (M–7528)	Katalógusszám
Etilén-glikol	2 M	E–9129
Dimetil-szulfoxid	2 M	D–2650

c, Második ekvilibráció során alkalmazott oldat (V2)

Kiegészítés	Hepes–TCM-199-oldat (M–7528)	Katalógusszám
Etilén-glikol	6,5 M	E–9129
Dimetil-szulfoxid	6,5 M	D–2650
Szaharóz	0,4 M	S–1880

7. melléklet

A visszaolvasztás során alkalmazott oldatok összetétele

a, Első ekvilibrációkor alkalmazott oldat (M1)

Kiegészítés	Hepes–TCM-199-oldat (M–7528)	Katalógusszám
Szaharóz	0,75 M	S–1880

b, Második ekvilibráció során alkalmazott oldat (M2)

Kiegészítés	Hepes–TCM-199-oldat (M–7528)	Katalógusszám
Szaharóz	0,5 M	S–1880

8. melléklet

IVF során alkalmazott oldat, mTBM (módosított Tris Buffered Medium) összetétele

Megnevezés	g/100ml	Katalógusszám
CaCl ₂ × 2 H ₂ O	0,1102	C-7902
Glükóz	0,1982	G-6152
KCl	0,0224	P-5405
NaCl	0,6610	S-5886
Na-piruvát	0,0550	P-2256
TRIS	0,2422	T-1410
Penicillin	0,0065	P-3539
BSA	0,1 %	A-9418
Koffein	2,5 mM	C-0750

9. melléklet

Az embriótenyésztéshez használt NCSU-23 médium összetétele

Megnevezés	g/100 ml	Katalógusszám
CaCl ₂ × 2H ₂ O	0,0256	C-7902
Glutamin	0,0146	G-8540
Glükóz	0,0999	G-6152
Hipotaurin	0,0546	H-1384
KCl	0,0356	P-5405
KH ₂ PO ₄	0,0162	P-5655
MgSO ₄ × 7H ₂ O	0,0293	M-7774
NaCl	0,6361	S-5886
NaHCO ₃	0,2108	S-5761
Na-piruvát	0,01	P-2256
Penicillin	0,0065	P-3539
Taurin	0,0876	T-8691
Na-laktát	0,1 ml	L-4263
Mem amino acid	1 ml	M-7020
BSA	0,4 %	A-9418

9. IRODALOMJEGYZÉK

Abe H, Yamashita S, Satoh T, Hoshi H (2002): Accumulation of cytoplasmic lipid droplets in bovine embryos and cryotolerance of embryos developed in different culture systems using serum-free or serum containing media. *Mol. Reprod. Dev.* 61: 57–66.

Abeydeera LR, Day BN (1997): *In vitro* penetration of pig oocytes in a modified Tris-buffered medium: effect of BSA, caffeine and calcium. *Therio.* 48: 537–544.

Abeydeera LR, Johnson LA, Welch GR, Wang WH, Boquest AC, Cantley C, Rieke A, Day BN (1998): Birth of piglets preselected for gender following *in vitro* fertilization of *in vitro* matured pig oocytes by X and Y chromosome bearing spermatozoa sorted high speed flow cytometry. *Therio.* 50: 981–988.

Abeydeera LR, Wang WH, Cantley TC, Rieke A, Prather RS, Day BN (1999): Epidermal growth factor can enhance the developmental competence of pig oocytes matured *in vitro* under protein-free culture conditions. *Therio.* 51: 365.

Abeydeera LR, Wang WH, Cantley TC, Rieke A, Murphy CN, Prather RS, Day BN (2000): Development and viability of pig oocytes matured *in vitro* under protein-free medium containing epidermal growth factor. *Therio.* 54: 787–797.

Abeydeera LR (2002): *In vitro* production of embryos in swine. *Therio.* 57: 257–273.

Agca Y, Monson RL, Northey DL, Mazni OA, Schaefer DM, Rutledge JJ (1998): Transfer of fresh and cryopreserved IVP bovine embryos: Normal calving, birth weight and gestation lengths. *Therio.* 50: 147–62.

Agca Y, Men H, Mullen SF, Riley LK, Prather RS, Crister JK (2006): Quality of porcine embryos produced in two embryo culture media as assessed by total cell number and time course of blastocyst hatching. *Reprod. Fertil. Dev.* 18: 185.

Aksoy M, Takahashi Y, Hishinuma M, Elsheikh AS, Tanaka H, Kanagawa H (1999): Influences of retrieval stages and glutathione addition on post-thaw viability of quick frozen mouse morula during *in vitro* culture. *Therio.* 51: 681–687.

Alberio R, Zakhartchenko V, Motlik J, Wolf E (2001): Mammalian oocyte activation: lessons from the sperm and implications for nuclear transfer. *Int. J. Dev. Biol.* 45: 797–809.

Aman R R, Parks JF (1994): Effects of cooling and rewarming on the meiotic spindle and chromosomes of *in vitro* matured bovine oocytes. *Biol. Reprod.* 50: 103–110.

- Ashworh PJC**, Harrison RAP, Miller NG, Plummer JM, Watson PJ (1994): Survival of ram spermatozoa at high dilution: protective effect of simple constituents of culture media as compared with seminal plasma. *Reprod. Fertil. Dev.* 6: 173–180.
- Austin CR** (1951): Observations on the penetration of the sperm into the mammalian egg. *Austral. J. Sci. Res.* 4: 581–596.
- Bach FH** (1997): Xenotransplantation: a possible option for the future. *Transplant. Proc.* 29: 2651–2652.
- Balakier H**, Casper RF (1993): Experimentally induced parthenogenetic activation of human oocytes. *Hum. Reprod.* 28: 740–743.
- Balakier H**, Sojecki A, Motamedi G, Librach C (2004): Time-dependent capability of human oocytes for activation and pronuclear formation during metaphase II arrest. *Hum. Reprod.* 19: 982–987.
- Bali Papp A**, Somfai T, Tartaglione M, Varga E, Gardón JC (2005): The effect of nerve growth factor on nuclear progression of porcine oocytes during *in vitro* maturation and embryo development. *Act. Vet. Hun.* 53: 91–101.
- Ball GD**, Wieben ED, Byers AP (1985): DNA, RNA, and protein synthesis by porcine oocyte – cumulus complexes during expansion. *Biol. Reprod.* 33: 739–744.
- Bavister BD**, Arlotto T (1990): Influence of single amino acids on the development of hamster one-cell embryos *in vitro*. *Mol. Reprod. Dev.* 25: 45–51.
- Beckmann LS**, Day BN (1993): Effect of medium NaCl concentration and osmolarity ion culture of the early stage porcine embryo and viability of embryos cultured in a selected superior medium. *Therio.* 39: 611–622.
- Ben-Yosef D**, Oron Y, Shalgi R (1993): Prolonged, repetitive calcium transients in rat oocytes fertilized *in vitro* and *in vivo*. *Febs. Lett.* 331: 239–242.
- Ben – Yosef D**, Shalgi R (1998): Early ionic events in activation of the mammalian egg. *R. Reprod.* 3: 96–103.
- Berthelot F**, Martinat-Botté F, Locatelli A, Perreau C, Terqui M (2000): Piglets born after vitrification of embryos using the Open Pulled Straw Method. *Cryobiol.* 41: 116–124.
- Bing YZ**, Hirao Y, Iga K, Che LM, Takenouchi N, Kuwayama M, Fuchimoto H, Rodriguez-Martinez H, Nagai T (2002): *In vitro* maturation and glutathione synthesis of porcine oocytes in the presence or absence of cysteamine under different oxygen tensions: role of the cumulus cells. *Reprod. Fertil. Dev.* 16: 125–131.
- Bing YZ**, Che L, Hirao Y, Takenouch N, Rodriguez-Martinez H, Nagai T (2003): Parthenogenetic activation and subsequent development of porcine

oocytes activated by a combined electric pulse and butyrolactone-I treatment. *J. Reprod. Dev.* 49: 159–166.

Brem G, Brening B, Goodman HM, Selden RC, Graf F, Kruff B, Springmann K, Hondele J, Meyer J, Winnaker EL, Krausslich H (1985): Production of transgenic mice, rabbits and pigs by microinjection into pronuclei. *Zuchthyg.* 20: 251–252.

Braga DPAF, Pasqualotto FF, Madaschi C, Carvalho T, Bonetti S, Rodriguez D, Iaconelli A, Borges E (2007): Use of pig oocytes for training new professionals in human assisted reproduction. *Fert. Ster. Megjelenés alatt.*

Bruce SS, Daneshmand ST, Forest CG, Aguirre M, Ross R (2007): Comparison of human chorionic gonadotropin and gonadotropin-releasing hormone agonist for final oocyte maturation in oocyte donor cycles. *Fert. Steril.* 88: 237–239.

Brüssow KP, Torner H, Rátky J, Hunter MG, Nurnberg G (1997): Ovum pick up in swine: the influence of aspiration vacuum pressure on oocyte recovery from preovulatory follicles. *Act. Vet. Hun.* 45: 189–196.

Calarco GP, Donahue RP, Szollosi D (1972): Germinal vesicle break down in the mouse oocyte. *J. Cell. Sci.* 10: 369–385.

Campbell KHS, Fisher P, Chen WC, Choi I, Kelly RDW, Lee JH, Xhu J (2007): Somatic cell nuclear transfer: Past, present and future perspectives. *Therio. Megjelenés alatt.*

Campos-Chillon LF, Walker DJ, de la Torre-Sanchez JF, Seidel GE, Jr (2006): *In vitro* assessment of a direct transfer vitrification procedure for bovine embryos. *Therio.* 65: 1200–1214.

Carrel DT, Middleton RG, Peterson CM, Jones KP, Urry RL (1993): Role of the cumulus in the selection of morphologically normal sperm and induction of the acrosome reaction during human *in vitro* fertilization. *Arch. Androl.* 31: 133–137.

Cascalho M, Ogle BM, Platt JL (2006): The future of organ transplantation. *Ann. Transplant.* 11: 44–47.

Catt JW, Rhodes SL (1995): Comparative intracytoplasmic sperm injection (ICSI) in human and domestic species. *Reprod. Fertil. Dev.* 7: 161–166.

Chang MC (1951): Fertilizing capacity of spermatozoa deposited into the Fallopian tubes. *Nat.* 168: 697–698.

Che L, Lalonde A, Bordignon V (2007): Chemical activation of parthenogenetic and nuclear transfer porcine oocytes using ionomycin and strontium chloride. *Therio.* 67: 1297–1304.

Cheng WTK (1985): *In vitro* fertilization of farm animal oocytes. PhD Thesis.

Cheng WTK, Moor R, Polge C (1986): *In vitro* fertilization of pig and sheep oocytes matured *in vivo* and *in vitro*. *Therio.* 25: 146.

Cherr GN, Lambert H, Meizel S, Katz DF (1986): *In vitro* studies of the golden hamster sperm acrosome reaction: Completion on the zona pellucida and induction by homologous soluble zonae pellucidae. *Dev. Biol.* 114: 119–131.

Cioffi JA, Van Blerkom J, Antczak M, Shafer A, Wittmer S, Snodgrass HR (1997): The expression of leptin and its receptors in pre-ovulatory human follicles. *Mol. Hum. Reprod.* 3: 467–472.

Clarke H, Masui J (1983): The induction of reversible and irreversible chromosome decondensation by protein synthesis inhibitor during meiotic maturation of mouse oocytes. *Dev. Biol.* 97: 291–301.

Clarke RN, Johnson LA (1987): Effect of liquid storage and cryopreservation of boar spermatozoa on acrosomal integrity and the penetration of zona-free hamster ova *in vitro*. *Gam. Res.* 16: 193–204.

Collas P, Balise JJ, Hofmann GA, Robl JM (1989): Electrical activation of mouse oocytes. *Therio.* 332: 835–853.

Coy P, Martinez E, Ruiz S, Vazquez JM, Roca J, Matas C (1993.b): *In vitro* fertilization of pig oocytes after different coincubation intervals. *Therio.* 39: 1201–1208.

Coy P, Martinez E, Ruiz S, Vazquez JM, Roca J, Matas C (1993.a): Sperm concentration influences fertilization and male pronuclear formation *in vitro* in pigs. *Therio.* 40: 539–546.

Coy P, Salvador L, Romar R, Campos I, Gadea J (1998): Maturation, fertilization and complete development of porcine oocytes matured under different systems. *Therio.* 51: 799–812.

Coy P, Romar R, Ruiz S, Gadea J, Matas C, Sellés E (2000): *In vitro* fertilization of pig oocytes in TALP and TCM-199 media. In proceeding of the 4th Annual ESDAR Conference. 26.

Coy P, Gadea J, Romar R, Matas C, García E (2002): The effect of *in vitro* fertilization medium on the acrosome reaction, cortical reaction, zona pellucida hardening, and *in vitro* development in the pig. *Reprod.* 124: 279–288.

Coy P, Romar R (2002): *In vitro* production of pig embryos: a point of view. *Reprod. Fertil. Dev.* 14: 275–286.

Cran DG, Cheng WTK (1986): Cortical reaction in pig oocytes during *in vivo* and *in vitro* fertilization. *Gam. Res.* 13: 241–251.

Cross NL (1998): Role of cholesterol in sperm capacitation. *Biol. Reprod.* 59: 7–11.

Cuthberston KSR (1983): Parthenogenetic activation of mouse oocytes *in vitro* with ethanol and benzyl alcohol. *J. Exp. Zool.* 226: 311–314.

Cuthbertson KS, Cobbold PH (1985): Phorbol ester and sperm activate mouse oocytes by inducing sustained oscillations in cell Ca^{2+} . *Nat.* 316: 541–542.

Csapó J, Husvéth F, Csapóné Kiss Zs, Horn P, Házás Z, Vargáné Visi É, Bócs K (1999): Fatty acid and cholesterol composition of the lard of different genotypes of swine. *Act. Agr. Kap.* 3: 1–13.

Daar AS (1999): Animal to human organ transplants a solution or a new problem? *Bull. WHO.* 77: 54–61.

Day BN, Abeydeera LR, Johnson LA, Welch GR, Wang WH, Cantley TC, Rieke A (1998): Birth of piglets preselected for gender following *in vitro* fertilization of *in vitro* matured pig oocytes by X and Y bearing spermatozoa sorted by high speed flow cytometry. *Therio.* 49: 360.

Daya S, Gwatkin RBL, Bissessar H (1987): Separation of motile human spermatozoa by means of glass bead column. *Gam. Res.* 17: 375–380.

Desai N, Lawson J, Goldfarb J (2000): Assessment of growth factor effects on post-thaw development of cryopreserved mouse morulae to the blastocyst stage. *Hum. Reprod.* 15: 410–418.

Didion BA, Martin MJ, Markert CL (1990a): Parthenogenetic activation of mouse and pig oocytes matured *in vitro*. *Therio.* 33: 1165–1175.

Didion BA, Pomp D, Martin MJ, Homanics GE, Markert CL (1990b): Observations on the cooling and cryopreservation of pig oocytes at the germinal vesicle stage. *J. Anim. Sci.* 68: 2803–2810.

Diez C, Duque P, Gómez E, Hidalgo CO, Tamargo C (2005): Bovine oocyte vitrification before or after meiotic arrest: effects on ultrastructure and developmental ability. *Therio.* 64: 317–333.

Dinnyés A, Hirao Y, Nagai T (2000): Parthenogenetic activation of porcine oocytes by electric pulse and/or butyrolactone-I treatment. *Clon.* 1: 209–216.

Dinnyés A, Yang X, Nagai T, Bagis H, Li H, Presicce GA, Gasparrini B, Neglia, G, Wilmut I (2001): Solid Surface Vitrification (SSV): an efficient method for oocyte and embryo cryopreservation in cattle, pig and mouse. *Cryobiol.* 43: 332.

Dinnyés A, Szmolenszky A (2005): Animal cloning by nuclear transfer: state of the art and future perspectives. *Act. Biochim. Pol.* 52: 585–588.

Dobrinsky JR, Johnson LA (1993): Effect of vitrification media on the *in vitro* development of porcine embryos. *Therio.* 39: 209.

Dobrinsky JR, Johnson LA, Rath D (1996a): Development of a culture medium (BECM-3) for porcine embryos: effects of bovine serum albumin and fetal bovine serum on embryo development. *Biol. Reprod.* 55: 1069–1074.

- Dobrinsky JR** (1996b): Cellular approach to cryopreservation of embryos. *Therio.* 45: 17–26.
- Dobrinsky JR** (1997): Cryopreservation of pig embryos. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 52: 301–312.
- Dobrinsky JR**, Pursel VG, Long CR, Johnson LA (2000): Birth of piglets after transfer of embryos cryopreserved by cytoskeletal stabilization and vitrification. *Biol. Reprod.* 62: 564–570.
- Dobrinsky JR** (2002): Advancements in cryopreservation of domestic animal embryos. *Therio.* 57: 285–302.
- Donahue RP** (1968): Maturation of the mouse oocytes *in vitro*. I. Sequence and timing of nuclear progression. *J. Exp. Zool.* 169: 237–249.
- Doumoulin JC**, Bergers-Janssen JM, Pieters MH, Enginsu ME, Geraedts JP, Evers JL (1994): The protective effects of polymers in the cryopreservation of human and mouse zonae pellucidae and embryos. *Fertil. Steril.* 62: 793–798.
- Ducibella T** (1991): Mammalian egg cortical granules and the cortical reaction. In *Elements of Mammalian Fertilization*: 205–231.
- Ducibella T**, Huneau D, Angelichio E, Xu Z, Schultz RM, Kopf GS, Fissore R, Madoux S, Ozil JP (2002): Egg-to-embryo transition is driven by differential responses to Ca²⁺ oscillation number. *Dev. Biol.* 250: 280–291.
- Ducibella T**, Schultz MR, Ozil JP (2006): Role of calcium signals in early development. *Biol.* 17: 324–332.
- Edwards RG** (1965): Maturation *in vitro* of mouse, sheep, cow, pig, rhesus monkey and human ovarian oocytes. *Nat.* 208: 349–351.
- Edwards RG**, Bavister BD, Steptoe PC (1969): Early stages of fertilization *in vitro* of human oocytes matured *in vitro*. *Nat.* 221: 632–635.
- Egerszegi I**, Schneider F, Rátky J, Soos F, Solti L, Manabe N, Brüssow KP (2003): Comparison of luteinizing hormone and steroid hormone secretion during the peri- and post-ovulatory periods in Mangalica and Landrace gilts. *J. Reprod. Dev.* 49: 291–296.
- Ereky K** (1919): *Biotechnologie der Fleisch-, Fett- und Milcherzeugung im landwirtschaftlichen Grosbetriebe*. Berlin: Verlag Paul Parey: 2–5.
- Esaki R**, Ueda H, Kurome M, Hirakawa K, Tomii R, Yoshioka H, Ushijima H, Kuwayama M, Nagashima H (2004): Cryopreservation of porcine embryos derived from *in vitro* matured oocytes. *Biol. Reprod.* 71: 432–437.
- Faber DC**, Molina JA, Ohlrichs CL, Van der Zwaag DF, Ferne LB (2003): Commercialization of animal biotechnology. *Therio.* 59: 125–138.
- Fahy GM**, McFarlane DR, Angell CA, Meryman HT (1984): Vitrification as an approach to cryopreservation. *Criobiol.* 21: 407–426.

Fair T, Lonergan P, Dinnyeés A, Cottell DC, Hyttel P, Ward FA, Boland MP (2001): Ultrastructure of bovine blastocysts following cryopreservation: Effect of method of blastocyst production. *Mol. Reprod. Dev.* 58: 186–195.

Fazeli AR, Steenwe GW, Bevers MM, Loos FA, Broek J, Bracher V, Parlevliet J, Colenbrander B (1995): Relationship between stallion sperm binding to homologous hemizona and fertility. *Therio.* 44: 751–760.

Fissore RA, Robl JM (1994): Mechanism of calcium oscillations in fertilized rabbit eggs. *Dev. Biol.* 166: 634–642.

Fissore RA, Dobirnsky JR, Balise JJ, Duby RT and Robl JM (1992): Patterns of intracellular Ca^{2+} concentrations in fertilized bovine eggs. *Biol. Reprod.* 47: 960–969.

Fujihara T, Kishida R, Fukui Y (2004a): Developmental capacity of vitrified immature porcine oocytes following ICSI: effects of cytochalasin-B and cryoprotectants. *Cryobiol.* 49: 286–290.

Fujihara T, Kinoshita M, Asaki M, Ohnishi M, Ishikawa H, Oshumi S, Fukui Y (2004b): Comparative studies on lipid analysis and ultra structure in porcine and Southern Minkie Whale (*Balaenoptera Bonaerensis*) oocytes. *J. Reprod. Dev.* 50: 525–532.

Fujihara T, Nagai H, Fukui Y (2005): Relationship between equilibration times and the presence of cumulus cells, and effect of taxol treatment for vitrification of *in vitro* matured porcine oocytes. *Criobiol.* 51: 339–343.

Funahashi H, Day BN (1993): Effects of different serum supplements in maturation medium on meiotic and cytoplasmic maturation of pig oocytes. *Therio.* 39: 965–973.

Funahashi H, Cantley TC, Stumpf TT, Terlouw SL, Day BN (1994a): Use of low-salt culture medium for *in vitro* maturation of porcine oocytes in associated with elevated oocyte glutathione levels and enhanced male pronuclear formation after *in vitro* fertilization. *Biol. Reprod.* 51: 633–639.

Funahashi H, Cantley T, Stumpf TT, Terlouw SL, Day BN (1994b): *In vitro* development of *in vitro* matured porcine oocytes following chemical activation or *in vitro* fertilization. *Biol. Reprod.* 50: 1072–1077.

Funahashi H, Nagai T (2000): Sperm selection by a climbing-over-a-wall IVF method reduces the incidence of polyspermic penetration of porcine oocytes. *J. Reprod. Dev.* 46: 319–324.

Funahashi H, Asano A, Fujiwara T, Nagai T, Niwa K, Fraser LR (2000): Both fertilization promoting peptide and adenosine stimulate capacitation but inhibit spontaneous acrosome loss in ejaculated boar spermatozoa *in vitro*. *Mol. Reprod. Dev.* 55: 117–124.

Gadella BM, Van Gestel RA (2004): Bicarbonate and its role in mammalian sperm function. *Anim. Reprod. Sci.* 82/83: 307–319.

García-Rosello E, Coy P, García-Vázquez FA, Ruiz S, Matas C (2006): Analysis of different factors influencing the intracytoplasmic sperm injection (ICSI) yield in pigs. *Therio*. 66: 1857–1865.

Ghetler Y, Skutelsky B, Ben Nun I, Bendor L, Anihai D, Shalgi R (2006): Human oocyte cryopreservation and the fate of cortical granules. *Fertil. Steril.* 86: 2210–2216.

Gil MA, Lalantha R, Abeydeera LR, Day BN, Vazquez JM, Roca J, Martinez MA (2003): Effect of the volume of medium and number of oocytes during *in vitro* fertilization on embryo development in pigs. *Therio*. 60: 767–776.

Gil MA, Ruiz M, Cuello C, Vazquez JM, Roca J, Martinez EA (2004): Influence of sperm: oocyte ratio during *in vitro* fertilization of *in vitro* matured cumulus-intact pig oocytes on fertilization parameters and embryo development. *Therio*. 61: 551–560.

Gil MA, Almin C, Cuello C, Parilla I, Roca J, Vazquez JM, Martinez EA (2007): Brief coincubation of gametes in porcine *in vitro* fertilization: Role of sperm: oocyte ratio and post-coincubation medium. *Therio*. 67: 620–626.

Gross SD, Schwab MS, Lewellyn AL, Maller JL (1999): Induction of metaphase arrest in cleaving *Xenopus* embryos by the protein kinase p90^{Rsk}. *Scie.* 286: 1309–1310.

Gruppen CG, Man JC, McLPatrick SM, Madock S, Nottle MB (2002): Effect of 6-dymethylaminopurine on electrically activated *in vitro* matured porcine oocytes. *Mol. Reprod. Dev.* 62: 387–396.

Gruppen CG, Nottle MB (2003): A simple modification of the *in vitro* fertilization procedure improves the efficiency of *in vitro* pig embryo production. *Therio*. 53: 422.

Guerin P, Guillaud J, Menezo Y (1995): Hypotaourine in spermatozoa and genital secretions and its production by oviduct epithelial cells *in vitro*. *Hum. Reprod.* 10: 866–872.

Haccard O, Sarevic B, Lewellyn A, Hartley R, Roy L, Izumi T, Erikson E, Maller JL (1993): Induction of metaphase arrest in cleaving *Xenopus* embryos by MAPK. *Sci.* 262: 1262–1265.

Hamawaki A, Kuwayama M, Hamano S (1999): Minimum volume cooling method for bovine blastocyst vitrification. *Therio*. 51: 165.

Hammer RE, Pursel VG, Rexroad CE, Jr Wall RJ, Bolt DJ, Ebert KM, Palmiter RD, Brinster RL (1985): Production of transgenic rabbits, sheep and pigs by microinjection. *Nat.* 315: 680–683.

Han YM, Wang WH, Abeydeera LR, Petersen AL, Kim JH, Murphy C, Day BN, Prather RS (1999): Pronuclear location before the first cell division determines ploidity of polyspermic pig embryos. *Biol. Reprod.* 61: 1340–1346.

- Harrison RAP** (1997): Sperm plasma membrane characteristics and boar semen fertility. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 52: 195–211.
- Hedrick JL**, Wardrip NJ (1987): On the macromolecular composition of the zona pellucida from porcine oocytes. *Dev. Biol.* 121: 478–488.
- Hochi S**, Akiyama M, Minagawa G, Kimura K, Hanada A (2001): Effects of cooling and warming rates during vitrification on fertilization of *in vitro*-matured bovine oocytes. *Cryobiol.* 42: 69.
- Hong JY**, Yong HY, Lee BC, Hwang WS, Lim JM, Lee ES (2004): Effect of amino acids on maturation, fertilization and embryo development of pig follicular oocytes in two IVM media. *Therio.* 62: 1473–1482.
- Hunter RHF**, Polge C (1966): Maturation of follicular oocytes in the pig after injection of human chorionic gonadotrophin. *J. Reprod. Fertil.* 12: 525–531.
- Hunter RHF**, Nichol R (1988): Capacitation potential of the fallopian tube: a study involving surgical insemination and the subsequent incidence of polyspermy. *Gam. Res.* 21: 255–266.
- Hunter RHF**, Rodriguez – Martinez H (2004): Capacitation of mammalian spermatozoa *in vivo*, with a specific focus on events in the Fallopian Tubes. *Mol. Reprod. Dev.* 67: 243–250.
- Illmensee K** (2002): Biotechnology in reproductive medicine. *Diff.* 69: 167–173.
- Iritani A**, Niwa K, Imai H (1978): Sperm penetration of pig follicular oocytes matured in culture. *J. Reprod. Fertil.* 54: 379–383.
- Isachenko V**, Soler C, Isachenko E, Perez-Sanchez F (1998): Vitrification of immature porcine oocytes: effects of lipid droplets, temperature, cytoskeleton and addition and removal of cryoprotectant. *Cryobiol.* 36: 250–253.
- Ito M**, Iwata MH, Kitagawa Y, Kon Y, Kuwayama T, Monji Y (2007): Effect of follicular fluid collected from various diameter follicles on the progression of nuclear maturation and developmental competence of pig oocytes. *Anim. Reprod. Sci. Megjelenés alatt.*
- Jaffe L** (1983): Sources of calcium in egg activation: a review and hypothesis. *Dev. Biol.* 99: 256–276.
- Johnson MH**, Pickering SJ (1987): The effect of dymethylsulfoxide on the microtubular system of the mouse oocyte. *Dev.* 100: 313–324.
- Jones DP** (1985): The role of oxygen concentration in oxidative stress: hypoxic and hyperoxic models. In: Sies H. (ed). *Oxidative stress*. Academic Press, London. 151–195.
- Jones KT**, Carroll J, Merriman JA, Whittingham DG, Kono T (1995): Repetitive sperm-induced Ca^{2+} transients in mouse oocytes are cell cycle dependent. *Dev.* 121: 3259–3266.

Ju JC, Tsay C, Ruan CW (2003): Alterations and reversibility in the chromatin, cytoskeleton and development of pig oocytes treated with roscovitine. *Mol. Reprod. Dev.* 64: 482–491.

Karja NW, Wongsrikeao P, Murakami M, Agung B, Fahrudin M, Nagai T, Otoi T (2004): Effects of oxygen tension on the development and quality of porcine *in vitro* fertilized embryos. *Therio.* 62: 1585–1595.

Kasai M, Mukaida T (2004): Cryopreservation of animal and human embryos by vitrification. *Reprod. Biomed. Onl.* 9: 164–170.

Kashiwazaki N, Kikuchi K, Suzuki K, Noguchi J, Nagai T, Kaneko H, Shino M (2002): Development *in vivo* and *in vitro* to blastocysts of porcine oocytes matured and fertilized and cultured *in vitro*. *J. Reprod. Dev.* 47: 303–310.

Katayama M, Rieke A, Cantley T, Murphy C, Dowell L, Sutovsky P, Day BN (2007): Improved fertilization and embryo development resulting in birth of live piglets after intracytoplasmic sperm injection and *in vitro* culture in a cysteine-supplemented medium. *Therio.* 67: 835–847.

Kelly J, Kleemann D, Kuwayama M, Walker S (2006): Effect of cysteamine on survival of bovine and ovine oocytes vitrified using the minimal volume cooling (MVC) cryotop method. *Reprod. Fertil. Dev.* 18: 158.

Kikuchi K, Nagai T, Kashiwazaki N, Ikeda H, Noguchi J, Shimada A, Soloy E, Kaneko H (1998): Cryopreservation and ensuing *in vitro* fertilization ability of boar spermatozoa from epididymis stored at 4 degrees C. *Therio.* 50: 615–623.

Kikuchi K, Kashiwazaki N, Noguchi J, Shimada A, Takahashi R, Hirabayashi M, Shino M, Ueda M, Kaneko H (1999): Developmental competence after transfer to recipients of porcine matured, fertilized and cultured *in vitro*. *Biol. Reprod.* 60: 336–340.

Kikuchi K, Onishi A, Kashiwazaki N, Iwamoto M, Noguchi J, Kaneko H, Akita T, Nagai T (2002): Successful piglet production after transfer blastocysts produced by a modified *in vitro* system. *Biol. Reprod.* 66: 1033–1041.

Killian JG (2004): Evidence for the role of oviduct secretions in sperm function, fertilization and embryo development. *Anim. Reprod. Sci.* 82–83: 141–153.

Kim NH, Funahashi H, Abeydeera LR, Moon SJ, Prather RS, Day BN (1997): Effects of oviductal fluid on sperm penetration and cortical granules exocytosis during fertilization of pig oocytes *in vitro*. *J. Reprod. Fertil. Dev.* 107: 79–86.

Kitagawa Y, Suzuki K, Yomeda A, Watanabe T (2004): Effects of oxygen concentration and antioxidants on the *in vitro* developmental ability, production of reactive oxygen species (ROS), and DNA fragmentation in porcine embryos. *Therio.* 62: 1186–1197.

Kline D, Kline JT (1992): Repetitive calcium transients and the role of calcium in exocytosis and cell cycle activation in the mouse egg. *Dev. Biol.* 149: 80–89.

Knight PG, Glister C (2001): Potential local regulatory functions of inhibins, activins and follistatin in the ovary. *Reprod.* 121: 503–512.

Koo DB, Kim NH, Lee HT, Chung KS (1997): Effects of fetal calf serum, amino acids, vitamins and insulin on blastocoel formation and hatching of *in vivo* and IVM/IVF-derived porcine embryos developing *in vitro*. *Therio.* 48: 791–802.

Kosower NS, Kosower EM (1978): The glutathione status of cells. *Int. Rev. Cytol.* 54: 109–160.

Kragh PM, Mtango NR, Corydon TL, Bolund L, Callesen H, Vajta G (2005): Combined electrical and chemical activation of zona free porcine oocytes. *Reprod. Fertil. Dev.* 17: 284.

Krisher RL, Bavister BD (1999): Enhanced glycolysis after maturation of bovine oocytes *in vitro* is associated with increased developmental competence. *Mol. Reprod. Dev.* 53: 19–26.

Krisher RL, Brad AM, Herrick JR, Sparman ML, Swain JE (2007): Comparative analysis of metabolism and viability in porcine oocytes during *in vitro* maturation. *Anim. Reprod. Sci.* 98: 72–96.

Krivokharchenko A, Popova E, Zaitseva I, Vilianovich L, Ganten D, Bader M (2002): Development of parthenogenetic rat embryos. *Biol. Reprod.* 68: 829–836.

Kubiak JZ, Weber M, De Pennart H, Winston NJ, Maro B (1993): The metaphase arrest in mouse oocytes is controlled through microtubule-dependent destruction of cyclin B in the presence of CSF. *Embo. J.* 12: 3773–3778.

Kulcsár M (2007): Clinical endocrinology of leptin in ruminants. PhD. dissertation.

Kun Z, Shaohua W, Yufang M, Yankun L, Hengxi W, Xiuzhu S, Yonghui Z, Yan L, Yunpig D, Lei Z, Ning L (2007): Effects of leptin supplementation in *in vitro* maturation medium on meiotic maturation of oocytes and preimplantation development of parthenogenetic and cloned embryos in pigs. *Anim. Reprod. Sci.* 101: 85–96.

Kuleshova LL, McFarlane DR, Trounson AO, Shaw JM (1999): Sugars exert a major influence on the vitrification properties of ethylene glycol-based solutions and have low toxicity to embryos and oocytes. *Cryobiol.* 38: 119–130.

Kühholzer B, Müller S, Treuer J, Seregi J, Besenfelder U, Brem G (1997): Repeated endoscopic ovum pick up in hormonally untreated ewes: a new technique. *Therio.* 48: 545–550.

- Kuwayama M**, Holm P, Jacobsen H, Greve T, Callesen H (1997): Successful cryopreservation of porcine embryos by vitrification. *Vet. Rec.* 141: 365.
- Lamirande E**, Leclerc P, Gagnon C (1997): Capacitation as a regulatory event that primes spermatozoa for the acrosome reaction and fertilization. *Mol. Hum. Reprod.* 3: 175–194.
- Langendonck AV**, Donnay I, Schuurbiens N, Auquier P, Carolan C, Massip A, Desy F (1997): Effects of supplementation with fetal calf serum on development of bovine embryos in synthetic oviduct fluid medium. *J. Reprod. Fert.* 109: 87–93.
- Laurincik J**, Kroslák P, Hyttel P, Pivko J, Sirotkin AV (1992): Bovine cumulus expansion and corona-oocyte disconnection during culture *in vitro*. *Reprod. Nutr. Dev.* 32: 151–161.
- Laurincik J**, Rath D, Niemann H (1994): Differences in pronucleus formation and first cleavage following *in vitro* fertilization between pig oocytes matured *in vivo* and *in vitro*. *J. Reprod. Fertil.* 102: 277–284.
- Lawrence Y**, Withaker M, Swann K (1997): Sperm-egg fusion is the prelude to the initial Ca^{2+} increase at fertilization in the mouse. *Dev.* 124: 233–241.
- Le Beux G**, Richard FJ, Sirard MA (2003): Effect of cycloheximide, 6-DMAP, roscovitine and butyrolactone-I on resumption of meiosis in porcine oocytes. *Therio.* 60: 1049–1058.
- Lee CN**, AX RL (1984): Concentrations and composition of glycosaminoglycans in the female bovine reproductive tract. *J. Dairy* 67: 2006–2009.
- Lee GS**, Kim HS, Hyun SH, Lee SH, Jeon HY, Nam DH, Jeong YW, Kim S, Kim JH, Han JY (2005): Production of transgenic cloned piglets from genetically transformed fetal fibroblasts selected by green fluorescent protein. *Therio.* 63: 973–991.
- Lee WJ**, Tian CX, Yang X (2004): Optimization of parthenogenetic activation protocol in porcine. *Mol. Reprod. Dev.* 68: 51–57.
- Leese HJ** (1988): The formation and function of oviduct fluid. *J. Reprod. Fert.* 82: 843–856.
- Leese HJ**, Tay JI, Reischl J, Downing SJ (2001): Formation of Fallopian tubal fluid: role of a neglected epithelium. *Reprod.* 121: 339–346.
- Leibo SP**, Loskutoff NM (1993): Cryobiology of *in vitro*-derived bovine embryos. *Therio.* 39: 81–94.
- Li YH**, Ma W, Li M, Hou Y, Jiao LH, Wang WH (2003): Reduced polyspermic penetration in porcine oocytes inseminated in a new *in vitro* fertilization system: straw IVF. *Biol. Reprod.* 69: 1580–1585.
- Liebermann J**, Nawroth F, Isachenko V, Isachenko E, Rahimi G, Tucker MJ (2002): Potential importance of vitrification in reproductive medicine. *Biol. Reprod.* 67: 1671–1680.

Liebermann J, Dietl J, Vanderzwalmen P, Tucker MJ (2003): Recent developments in human oocyte, embryo and blastocyst vitrification: Where are we now? *Reprod. Biomed. Onl.* 7: 623–633.

Liu L, Moor RM (1997): Factors affecting electrical activations of porcine oocyte matured *in vitro*. *Anim. Reprod. Sci.* 48: 67–80.

Lonergan P, O’Kearney Flynn M, Boland MP (1999): Effect of protein supplementation and presence of an antioxidant on the development of bovine zygotes in synthetic oviduct fluid medium under high or low oxygen tension. *Therio.* 51: 1565–1576.

Loren J, Lacham-Kaplan O (2006): The employment of strontium to activate mouse oocytes: effects on spermatid-injection outcome. *Reprod.* 131: 259–267.

Luberda Z (2005): The role of glutathione in mammalian gametes. *Reprod. Biol.* 5: 5–17.

Ma SF, Liu XY, Miao DQ, Han ZB, Zhang X, Miao YL (2005): Parthenogenetic activation of mouse oocytes by strontium chloride: a search for the best conditions. *Therio.* 64: 1142–1157.

Machatkova M, Krausova K, Jokesova E, Tomanek M (2004): Developmental competence of bovine oocytes: effects of follicle size and the phase of follicular wave on *in vitro* embryo production. *Therio.* 61: 329–335.

Macháty Z, Mayers MA, Prather RS (1996): Inositol 1,4,5-triphosphate induces parthenogenesis in porcine oocytes. *Therio.* 45: 155.

Macháty Z, Mayes MA, Kovacs LG, Balatti PA, Kim JH, Prather RS (1997): Activation of porcine oocytes via an exogenously introduced rat muscarinic M1 receptor. *Biol. Reprod.* 57: 85–91.

Macháty Z, Day BN, Prather RS, (1998): Development of early porcine embryos *in vitro* and *in vivo*. *Biol. Reprod.* 59: 451–455.

Macháty Z, Prather RS (1998): Strategies for activating nuclear transfer oocytes. *Reprod. Fertil. Dev.* 10: 599–614.

Maedomari N, Kikuchi K, Ozawa M, Noguchi J, Kaneko H, Ohnuma K, Nakai M, Shino M, Nagai T, Kashiwazaki N (2007): Cytoplasmic glutathione regulated by cumulus cells during porcine oocyte maturation affects fertilization and embryonic development *in vitro*. *Therio.* 67: 983–993.

Martin MJ (2000): Development of *in vivo* matured porcine oocytes following intracytoplasmic sperm injection. *Biol. Reprod.* 63: 109–112.

Martinez MB, Dominguez E, Alonso C, Diaz C, Garcia P, Sanchez R (2001): Effect of IVF medium and sperm concentration on fertilization parameters. In: *Proceedings of the 6th International Conference on Pig Reproduction.* 75.

Marques MG, Nicacio AC, Oliviera VP, Nascimento AB, Caetano HVA, Mendes CM, Mello MRB, Milazzotto MP, Assumpcao MEO, Vistin JA (2007): *In*

vitro maturation of pig oocytes with different media, hormone and meiosis inhibitors. Anim. Reprod. Sci. 97: 375–381.

Mastroianni L, Jones R (1965): Oxygen tension within the rabbit fallopian tube. J. Reprod. Fertil. 39: 99–102.

Matas C, Coy P, Romar R, Marco M, Gadea J, Ruiz S (2003): Effect of sperm preparation method on *in vitro* fertilization in pigs. Reprod. 125: 133–141.

Mattioli M, Galeati G, Bacci ML, Seren E (1988): Follicular factors influence oocyte fertilizability by modulating the intracellular cooperation between cumulus cells and oocyte. Gamete Res. 21: 223–232.

Mattioli M, Bacci ML, Seren E (1989): Developmental competence of pig oocytes matured and fertilized *in vitro*. Therio. 31: 1201–1207.

Mattioli M, Bacci ML, Galeati G, Seren E (1991): Effects of LH and FSH on the maturation of pig oocytes *in vitro*. Therio. 36: 95–105.

Marchal R, Vigneron C, Perreau C, Bali Papp Á, Mermillod P (2002): Effect of follicular size on meiotic and developmental competence of porcine oocytes. Therio. 57: 1523–1532.

Massip A, Van Der Zwalm P, Scheffen B, Ectors F (1986): Pregnancies following transfer of cattle embryos preserved by vitrification. Cryo. Let. 7: 270–273.

Meinecke B, Meinecke–Tillmann S (1979): Effects of gonadotropins on oocyte maturation and progesterone production by porcine ovarian follicles cultured *in vitro*. Therio. 11: 351–365.

Meister A, Anderson ME (1983): Glutathione. Ann. Rev. Biochem. 52: 711–760.

Men H, Agca Y, Crister ES, Crister JK (2005): Beneficial effects of serum supplementation during *in vitro* production of porcine embryos on their ability to survive cryopreservation by open pulled straw vitrification. Therio. 64: 1340–1349

Meo SC, Leal CL, Garcia JM (2004): Activation and early parthenogenesis of bovine oocytes treated with ethanol and strontium. Anim. Reprod. Sci. 81: 35–46.

Modina S, Bretta M, Lodde V, Laurina A, Luciano AM (2004): Cytoplasmic changes and developmental competence of bovine oocytes cryopreserved without cumulus cells. Eur. J. Histochem. 48: 337–346.

Molnár M, Pribenszky Cs, Cseh S, Solti L (2002): Investigation on viability of embryos after exposing to high hydrostatic pressure. Therio. 57: 506.

Moore K, Bonilla AQ (2006): Cryopreservation of mammalian embryos: The state of the art. Biomed. Sci. 8: 19–32.

Motlik J, Fulka J (1976): Breakdown of the germinal vesicle in pig oocytes *in vivo* and *in vitro*. J. Exp. Zool. 198: 155–162.

Motlik J, Fulka J, Fléchow JE (1986): Changes in the intracellular coupling between pig oocytes and cumulus cells during maturation *in vivo* and *in vitro*. J. Reprod. Fertil. 76: 31–37.

Moses RM, Masui Y (1994): Enhancement of mouse egg activation by the kinase inhibitor, 6-dimethylaminopurine (6-DMAP). J. Exp. Zool. 270: 211–218.

Moses RM, Kline D (1995): Release of mouse eggs from metaphase arrest by protein synthesis inhibition in the absence of a calcium signal or microtubule assembly. Mol. Reprod. Dev. 41: 264–273.

Moses RM, Kline D, Masui Y (1995): Maintenance of metaphase in colcemid-treated mouse eggs by distinct calcium and 6-dimethylaminopurine (6-DMAP)-sensitive mechanisms. Dev. Biol. 167: 829–837.

Mucci N, Aller J, Kaiser GG, Hozbor F, Cabodevila J, Alberio RH (2006): Effect of estrous cow serum during bovine embryo culture on blastocyst development and cryotolerance after slow freezing or vitrification. Therio. 65: 1551–1562.

Myazaki S, Hashimoto N, Yoshimoto Y, Kishimoto T, Igusa Y, Hiramoto Y (1986): Temporal and spatial dynamics of the periodic increase in intracellular free calcium at fertilization of golden hamster eggs. Dev. Biol. 118: 259–267.

Nagai T, Niwa K, Iritani A (1984): Effect of sperm concentration during preincubation in a defined medium on fertilization *in vitro* of pig follicular oocytes. J. Reprod. Fertil. 70: 271–275.

Nagai T, Moor RM (1990): Effect of oviduct cells on the incidence of polyspermy in pig eggs fertilized *in vitro*. Mol. Reprod. Dev. 26: 377–382.

Nagai T (1992): Development of bovine *in vitro*-matured follicular oocytes activated with ethanol. Therio. 37: 869–875.

Nagai T, Ding J, Moor RM (1993): Effect of follicle cells and steroidogenesis on maturation and fertilization *in vitro* of pig oocytes. J. Exp. Zool. 266: 146–151.

Nagai T (1994): Current status and perspectives in IVM–IVF of porcine oocytes. Therio. 41: 73–78.

Nagai T, Ebihara M, Onishi A, Kubo M (1997): Germinal vesicle stages in pig follicular oocytes collected by different methods. J. Reprod. Dev. 43: 339–343.

Nagashima H, Kashiwazaki N, Ashman RJ, Grupen CG, Nottle MB (1995): Cryopreservation of porcine embryos. Nature 374: 416.

Nagashima H, Kuwayama M, Grupen CG, Ashman RJ, Nottle MB (1996): Vitrification of porcine early cleavage stage embryos and oocytes after removal of cytoplasmic lipid droplets. Therio. 45: 180.

- Nagashima H**, Cameron RDA, Kuwayama M, Young M, Bebe L, Blackshaw AW, Nottle MB (1999): Survival of porcine delipated oocytes and embryos after cryopreservation by freezing or vitrification. *J. Reprod. Dev.* 45: 167–176.
- Nánássy L**, Lee K, Javor A, Macháty Z (2007a): Changes in the MPF and MAPK activities in porcine oocytes activated by different methods. *Therio.* 68: 146–152.
- Nánássy L**, Lee, K, Jávora A, Macháty Z (2007b): Effects of activation methods and culture conditions on development of parthenogenetic porcine embryos. *Anim. Reprod. Sci. In press.*
- Nedambale TL**, Dinnyés A, Groen W, Dobrinsky JR, Tian XC, Yang X (2002): Comparison on in vitro fertilized bovine embryos cultured in KSOM or SOF and cryopreserved by slow freezing or vitrification. *Therio.* 62: 437–449.
- Nedambale TL**, Du F, Yang X, Tian XC (2006): Higher survival rate of vitrified and thawed in vitro produced bovine blastocysts following culture in defined medium supplemented with beta-mercaptoethanol. *Anim. Reprod. Sci.* 93: 61–75.
- Ng FLH**, Liu DY, Baker HW (1992): Comparison of Percoll, mini-Percoll and swim-up methods for sperm preparation from semen samples. *Hum. Reprod.* 7: 261–267.
- Niemann H** (1991): Cryopreservation of ova and embryos from livestock: current status and research needs. *Therio.* 35: 109–123.
- Niwa KJ** (1993): Effectiveness of *in vitro* maturation and *in vitro* fertilization techniques in pigs. *J. Reprod. Fertil.* 48: 49–59.
- Nixon VL**, Levasseur M, McDougall A, Jones KT (2002): Ca²⁺ oscillations promote APC/C-dependent cyclin B1 degradation during metaphase arrest and completion of meiosis in fertilizing mouse eggs. *Cur. Biol.* 12: 746–750.
- Nurse P** (1990): Universal control mechanism regulating onset of M-phase. *Nat.* 344: 503–508.
- Nussbaum DJ**, Prather RS (1995): Differential effects of protein synthesis inhibitors on porcine oocytes activation. *Mol. Reprod. Dev.* 41: 70–75.
- Okada K**, Miyaro T, Miyake M (2003): Activation of pig oocytes by intracytoplasmic injection of strontium and barium. *Zyg.* 11: 159–165.
- Okada K**, Krilov V, Kren R, Fulka J Jr. (2006): Development of pig embryos after electro-activation and *in vitro* fertilization in PZM-3 or PZM supplemented with fetal bovine serum. *J. Reprod. Dev.* 52: 91–98.
- O’Keefe SJ**, Wolfes H, Kiessling AA, Cooper GM (1989): Microinjection of antisense c-mos oligonucleotide prevents meiosis II in the maturing mouse egg. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 86: 7038–7042.

Otaegui PJ, O'Neill GT, Wilmut I (1999): Parthenogenetic activation of mouse oocytes by exposure to strontium as a source of cytoplasts for nuclear transfer. *Clon.* 1: 111–117.

Ozawa M, Nagai T, Kaneko H, Noguchi J, Ohnuma K, Kikuchi K (2006): Successful pig embryonic development *in vitro* outside a CO₂ gas-regulated incubator: Effects of pH and osmolality. *Therio.* 65: 860–869.

Pabon JE, Findley WE, Gibbons WE (1989): The toxic effect of short exposures to the atmospheric oxygen concentration on early mouse embryonic development. *Fertil. Steril.* 51: 896–900.

Parrish JJ, Foote RH (1987): Quantification of bovine sperm separation by swim-up method. Relationship to sperm motility, integrity of acrosomes, sperm migration in polyacrylamide gel and fertility. *J. Andr.* 8: 259–266.

Pavlok A (1981): Penetration of hamster and pig zona free eggs by boar ejaculated spermatozoa preincubated *in vitro*. *Int. J. Fertil.* 26: 101–106.

Pedro PB, Kasai M, Mammaru Y, Yokoyama E, Edashige K (1996): Changes in the permeability to different cryoprotectants of bovine oocytes and embryos during maturation and development. In: 13th Int. Congr. Anim. Reprod. 3. 15–19.

Petters RM, Wells KD (1993): Culture of pig embryos. *J. Reprod. Fertil.* 48: 61–73.

Pincus G, Enzmann EV (1934): Can mammalian eggs undergo normal development *in vitro*? *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 20: 121–122.

Platt JL (1997): Xenotransplantation: A potential solution to the shortage of donor organs. *Trans. Proc.* 29: 3324–3326.

Polge C, Wilmut I, Rowson LEA (1974): The low temperature preservation of cow, sheep and pig embryos. *Cryobiol.* 11: 560.

Prather RS, Tao T, Macháty Z (1999): Development of the techniques for nuclear transfer in pigs. *Therio.* 51: 487–498.

Presicce GA, Yang X (1994): Parthenogenetic development of bovine oocytes matured *in vitro* for 24 h and activated by ethanol and cycloheximide. *Mol. Reprod. Dev.* 38: 380–385.

Pribenszky Cs, Molnár M, Cseh S, Solti L (2004): Survival of mouse blastocysts after low temperature preservation under high pressure. *Act. Vet. Hun.* 52: 479–487.

Prochazka R, Kalab P, Nagyova E (2003): Epidermal growth factor – receptor tyrosine kinase activity regulates expansion of porcine oocyte-cumulus cell complexes *in vitro*. *Biol. Reprod.* 68: 797–803.

Rall WF (1987): Factors affecting the survival of mouse embryos cryopreserved by vitrification. *Cryobiol.* 24: 387–402.

- Rall WF** (1992): Cryopreservation of oocytes and embryos: methods and applications. *Anim. Reprod. Sci.* 28: 237–245.
- Rall WF, Fahy GM** (1985): Ice-free cryopreservation of mouse embryos at -196 degrees C by vitrification. *Nat.* 313: 573–575.
- Rath D** (1992): Experiments to improve *in vitro* fertilization techniques for *in vivo* matured porcine oocytes. *Therio.* 37: 885–896.
- Rath D, Johnson LA, Dobrinsky JR, Welch GR, Niemann H** (1996): Birth of piglets following *in vitro* fertilization using sperm flow cytometrically sorted for gender. *Therio.* 45: 256.
- Rath D, Niemann H** (1997): *In vitro* fertilization of porcine oocytes with fresh and frozen-thawed ejaculated or frozen-thawed epididymal semen obtained from identical boars. *Therio.* 47: 785–793.
- Rátky J, Brüssow KP, Egerszegi I, Torner H, Schneider F, Solti L, Manabe N** (2005): Comparison of follicular and oocyte development and reproductive hormone secretion during the ovulatory period in Hungarian native breed, Mangalica, and Landrace gilts. *J. Reprod. Dev.* 51: 427–432.
- Rodriguez-Martinez H, Tienthai P, Suzuki K, Funahashi K, Ekwall H, Johannisson A** (2001): Oviduct involvement in sperm capacitation and oocyte development. *Reprod.* 58: 129–145.
- Roh S, Hwang WS** (2002): *In vitro* development of porcine parthenogenetic and cloned embryos: comparison of oocyte-activating techniques, various culture systems and nuclear transfer methods. *Reprod. Fertil. Dev.* 14: 93–99.
- Rojas C, Palomo MJ, Albarracín JL, Mogas T** (2004): Vitrification of immature and *in vitro* matured pig oocytes: study of distribution of chromosomes, microtubules and actin microfilaments. *Cryobiol.* 49: 211–220.
- Romar R, Coy P, Gadea J, Rath D** (2005): Effect of oviductal and cumulus cells on zona pellucida and cortical granules of porcine oocytes fertilized *in vitro* with epididymal spermatozoa. *Anim. Reprod. Sci.* 85: 287–300.
- Romar R, Funahashi H** (2006): *In vitro* maturation and fertilization of porcine oocytes after a 48h culture in roscovitine, an inhibitor of p34 (*cdc2*)/cyclin B kinase. *Anim. Reprod. Sci.* 92: 321–332.
- Romar R** (2006): Master y doctorado. Biología y tecnología de la reproducción en los mamíferos. Cultivo de embriones porcinos. Universidad de Murcia. *Személyes közlés.*
- Sagata N, Watanabe N, Vande Woude GF, Ikawa Y** (1989): The cMOS proto-oncogene product is a cytostatic factor (CSF) responsible for meiotic arrest in vertebrate eggs. *Nat.* 342: 512–518.

Sato H, Iwata H, Hayashi T, Kimura K, Kuwayama T, Monji Y (2007): The effect of glucose on the progression of the nuclear maturation of pig oocytes. *Anim. Reprod. Sci.* 99: 299–305.

Schlegel R, Belinsky GS, Harris MO (1990): Premature mitosis induced in mammalian cells by the protein kinase inhibitors 2-aminopurine and 6-dimethyl-aminopurine. *Cell, Grow. Differ.* 1: 171–178.

Schultz RM, Kopf GS (1995): Molecular basis of mammalian egg activation. *Curr. Top. Dev. Biol.* 30: 21–61.

Shaw JM, Kuleshova LL, MacFarlane DR, Trounson AO (1997): Vitrification properties of solutions of ethylene glycol in saline containing PVP, Ficoll, or dextran. *Cryobiol.* 35: 219–229.

Shimokava H, Tomoike H, Nabeyama S, Yamamoto H, Araki H, Nakamura M, Ishi A, Tanaka K (1983): Coronary artery spasm induced in atherosclerotic miniature swine. *Sci.* 221: 560–562.

Singh B, Meng L, Rutledge JM, Armstrong DT (1997): Effects of epidermal growth factor and follicle stimulating hormone during *in vitro* maturation of porcine oocytes. *Mol. Reprod. Dev.* 46: 401–407.

Siracusa G, Whittingham DG, Molinaro M, Vivarelli E (1978): Parthenogenetic activation of mouse oocytes induced by inhibitors of protein synthesis. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 43: 157–166.

Sirard MA, Florman HM, Leibfried-Rutledge ML, Barnes FL, First NL (1989): Timing of nuclear progression and protein synthesis necessary for meiotic maturation of bovine oocytes. *Biol. Reprod.* 40: 1257–1263.

Sirard MA, Desroiser S, Assidi M (2007): *In vivo* and *in vitro* effects of FSH on oocyte maturation and developmental competence. *Therio. Megjelenés alatt.*

Smorag Z, Gajda B, Wieczorek B, Jura J (1989): Stage-dependent viability of vitrified rabbit embryos. *Therio*: 31: 1227–1231.

Solti L (1997): Klónozás: Áldás vagy átok? *Hun. Vet. J.* 119: 261–266.

Somfai T (1999): A sertés petesejtek aspirációja és *in vitro* maturáltatása. *Act. Agr. Ov.* 41: 101–112.

Somfai T, Kikuchi K, Onishi A, Iwamoto M, Fuchimoto D, Bali Papp A, Sato E, Nagai T (2003): Meiotic arrest maintained by cAMP during the initiation of maturation enhances meiotic potential and developmental competence and reduces polyspermy of IVM/IVF porcine oocytes. *Zyg.* 11: 199–206.

Somfai T, Kikuchi K, Onishi A, Iwamoto M, Fuchimoto D, Papp ÁB (2004): Relationship between the morphological changes of somatic compartment and the kinetics of nuclear and cytoplasmic maturation of oocytes during *in vitro* maturation of porcine follicular oocytes. *Mol. Reprod. Dev.* 68: 484–491.

Somfai T, Dinnyés A, Sage D, Marosán M, Carnwath IW, Ozawa M, Kikuchi K, Niemann H (2006): Development to the blastocyst stage of parthenogenetically activated *in vitro* matured porcine oocytes after solid surface vitrification (SSV). *Therio.* 66: 415–422.

Steen O, Adimoelja A, Steeno J (1975): Separation of X and Y bearing human spermatozoa with the Sephadex gel filtration method. *Androl.* 7: 95–97.

Sun FZ, Hoyland J, Huang X, Mason W, Moor RM (1992): A comparison of intracellular changes in porcine eggs after fertilization and electroactivation. *Dev.* 115: 947–956.

Suzuki K, Eriksson B, Shimizu H, Nagai T, Rodriguez – Martinez H (2000): Effect of hyaluronan on monospermic penetration of porcine oocytes fertilized *in vitro*. *Int. J. Androl.* 23: 13–21.

Suzuki K, Asano A, Eriksson B, Niwa K, Nagai T, Rodriguez-Martinez H (2002): Capacitation status and *in vitro* fertility of boar spermatozoa: effects of seminal plasma, cumulus-oocyte-complexes-conditioned medium and hyaluronan. *Int. J. Androl.* 25: 84–93.

Suzuki C, Yoshioka K, Itoh S, Kawarasaki T, Kikuchi K (2005): *In vitro* fertilization and subsequent development of porcine oocytes using cryopreserved and liquid-stored spermatozoa from various boars. *Therio.* 64: 1287–1296.

Suzuki M, Misumi K, Ozawa M, Noguchi J, Kaneko H, Ohnuma K, Fuchimoto D, Onishi A, Iwamoto M, Saito N, Nagai T, Kikuchi K (2006): Successful piglet production by IVF of oocytes matured *in vitro* using NCSU–37 supplements with fetal bovine serum. *Therio.* 65: 374–386.

Swann K, Ozil JP (1994): Dynamics of the calcium signal that triggers mammalian egg activation. *Int. Rev. Cytol.* 152: 183–222.

Swindle MM (1998): Defining appropriate health status and management programs for specific pathogen free swine for xenotransplantation. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 862: 111–120.

Szabó P (2006a): A mangalica reneszánsza. *Állatteny. Tak.* 55: 203–216.

Szabó P (2006b): A mangalica és más genotípusú sertések zsírszövetének zsírsavösszetétele. *Állatteny. Tak.* 55: 289–293.

Széll A, Shelton JN, Széll K (1989): Osmotic characteristics of sheep and cattle embryos. *Cryobiol.* 26: 297–301.

Takahashi S, Kubota C, Ogata Y, Tokunaga T, Imai H (1996): Parthenogenetic activation and development of bovine oocytes treated with protein synthesis or protein phosphorylation inhibitors. *Therio.* 45: 156.

Tanghe S, Soom AV, Nauwynck H, Coryn M, Kruif A (2002): Minireview: Functions of the cumulus oophorus during oocyte maturation, ovulation and fertilization. *Mol. Reprod. Dev.* 61: 414–424.

- Tatemoto H**, Muto N, Yim SD, Nakada T (2005): Antihyaluronidase oligosaccharide derived from chondroitin sulfate A effectively reduces polyspermy during *in vitro* fertilization of porcine oocytes. *Biol. Reprod.* 72: 127–134.
- Taylor CT**, Lawrence YM, Kingsland CR, Biljan MM, Cuthbertson KSR (1993): Oscillations in intracellular free calcium induced by spermatozoa in human oocytes at fertilization. *Hum. Reprod.* 8: 2174–2179.
- Tesarik J**, Sousa M (1995): More than 90 % fertilization rates after intracytoplasmic sperm injection and artificial induction of oocyte activation with calcium ionophore. *Fertil. Steril.* 63: 343–349.
- Tomashov-Matar R**, Tchetchik D, Eldar A, Kaplan-Kraicer R, Oron Y, Shalgi R (2005): Strontium-induced rat egg activation. *Reprod.* 130: 467–74.
- Torner H**, Brüssow KP, Alm H, Rátky J, Kanitz W (1998): Morphology of porcine cumulus-oocyte-complexes depends on the stage of preovulatory maturation. *Therio.* 50: 39–48.
- Töpfer-Petersen E**, Petrounkina AM, Ekhlesi-Hunderieser M (2000): Oocyte-sperm interactions. *Anim. Reprod. Sci.* 60/61: 653–662.
- Trounson A**, Mohr L (1983): Human pregnancy following cryopreservation, thawing and transfer of an eight cell embryo. *Nat.* 305: 707–709.
- Vajta G**, Holm P, Greve T, Callesen H (1997): Vitrification of porcine embryos using the Open Pulled Straw (OPS) method. *Acta. Vet. Scand.* 38: 349–352.
- Vajta G**, Kuwayama M (2006): Improving cryopreservation systems. *Therio.* 65: 236–244.
- Valdez CA**, Abas Mazni O, Takahashi Y, Fujikawa S, Kanagawa H (1992): Successful cryopreservation of mouse blastocysts using a new vitrification solution. *J. Reprod. Fertil.* 96: 793–802.
- Van Wagendonk-de Leeuw AM**, den Daas JH, Rall WF (1997): Field trial to compare pregnancy rates of bovine embryo cryopreservation methods: Vitrification and one-step dilution *versus* slow freezing and three-step dilution. *Therio.* 48: 1071–1084.
- Verlhac MH**, Kubiak JZ, Clarke HJ, Maro B (1994): Microtubule and chromatin behaviour follow MAPK activity but not MPF activity during meiosis in mouse oocytes. *Dev.* 120: 1017–1025.
- Visintin JA**, Martins JF, Bevilacqua EM, Mello MR, Nicacio AC, Assumpcao ME (2002): Cryopreservation of *bos taurus* vs *bos indicus* embryos: Are they really different? *Therio.* 57: 345–359.
- Wang WH**, Abeydeera LR, Han YH, Prather RS, Day BN (1997a): Effects of oocyte maturation media on development of pig embryos produced by *in vitro* fertilization. *J. Reprod. Fertil.* 111: 101–108.

Wang WH, Hosoe M, Shioya Y (1997b): Induction of cortical granule exocytosis of pig oocytes by spermatozoa during meiotic maturation. J. Reprod. Fertil. 109: 247–255.

Wang WH, Abeydeera LR, Prather RS, Day BN (1998): Morphologic comparison of ovulated and *in vitro* matured porcine oocytes, with particular reference to polyspermy after *in vitro* fertilization. Mol. Reprod. Dev. 49: 308–316.

Wang WH, Macháty Z, Ruddock N, Abeydeera LR, Boquest AC, Prather RS, Day BN (1999): Activation of porcine oocytes with calcium ionophore: Effects of extracellular calcium. Mol. Reprod. Dev. 53: 99–107.

Wang WH, Day BN (2002): Development of porcine embryos produced by IVM/IVF in a medium with or without protein supplementation: effects of extracellular glutathione. Zyg. 10: 109–115.

Weber PK, McGinnis LK, Youngs CR (1992): An evaluation of potential vitrification solutions for cryopreservation of porcine embryos. Therio. 37: 321.

Wehrend A, Meinecke B (2001): Kinetics of meiotic progression, M-phase promoting factor (MPF) and mitogen-activated protein kinase (MAP kinase) activities during *in vitro* maturation of porcine and bovine oocytes: species specific differences in the length of the meiotic stages. Anim. Reprod. Sci. 31: 175–184.

Wells KD, Tabbaa MJ, Petters RM (1992): Supplementation of murine embryo culture media with taurine or sorbitol. Biol. Reprod. 46: 166.

Whitaker M, Swann (1993): Lighting the fuse at fertilization. Dev. 117: 1–12.

White KL, Hehnke K, Rickords LF, Southern LL, Thompson DL, Wood TC (1989): Early embryonic development *in vitro* by culture with oviductal epithelial cells in pigs. Biol. Reprod. 41: 425–430.

Whittingham DG, Leibo SP, Mazur P (1972): Survival of mouse embryos frozen to -196 degrees and -269 degrees. C. Sci. 78: 411–414.

Wilmot I, Rowson LE (1973): Experiments on the low-temperature preservation of cow embryos. Vet. Rec. 92: 686–690.

Wu GM, Quin PC, Tan JH, Wang LA (1992): *In vitro* fertilization of *in vitro* matured pig oocytes. Therio. 37: 323.

Wu GM, Sun QJ, Mao J, Lai L, McCauley TC, Park KW, Prather RS, Didion BA, Day BN (2002): High developmental competence of pig oocytes after meiotic inhibition with a specific M-phase promoting factor kinase inhibitor, butyrolactone-I. Biol. Reprod. 67: 170–177.

Wu GM, Lai L, Mao J, McCauley TC, Caamano JN, Cantley T, Rieke A, Murphy CN, Prather RS, Didion AB (2004): Birth of piglets by *in vitro* fertilization of zona-free porcine oocytes. Therio. 62: 1544–1556.

Xia P, Tekpetey FR, Armstrong DT (1994): Effect of IGF-I on pig maturation, fertilization, and early embryonic development *in vitro* and on granulosa and cumulus cell biosynthetic activity. *Mol. Reprod. Dev.* 38: 373–379.

Xu Z, Kopf GS, Schultz RM (1994): Involvement of inositol 1,4,5-triphosphate-mediated Ca^{2+} release in early and late events of mouse egg activation. *Dev.* 120: 1851–1859.

Xu X, Seth P, Harbison DS, Cheung AP, Foxcroft GR (1995): Semen dilution for assessment of boar ejaculate quality in pig IVM and IVF systems. *Therio.* 46: 1325–1337.

Yanagimachi R. (1994): Mammalian fertilization. In: Knobil, E., Neill, J.D. (Eds.), *The Physiology of Reproduction*, second ed. Raven Press, New York. 189–317.

Yang X, Tian XC, Dai Y, Wang B (2000): Transgenic farm animals: applications in agriculture and biomedicine. *Biotech. Ann. Rev.* 5: 269–292.

Yang YJ, Cao YJ, Bo SM, Peng S, Liu WM, Duan EK (2006): Leptin-directed embryo implantation: leptin regulates adhesion and outgrowth of mouse blastocysts and receptivity of endometrial epithelial cells. *Anim. Reprod. Sci.* 92. 155–167.

Ye J, Campbell KHS, Craigon J, Luck MR (2005): Dynamic changes in meiotic progression and improvement of developmental competence of pig oocytes *in vitro* by follicle stimulating hormone and cycloheximide. *Biol. Reprod.* 72: 399–406.

Yi JS, Park CS (2005): Parthenogenetic development of porcine oocytes treated by ethanol, cycloheximide, cytochalasin B and 6-dimethylaminopurine. *Anim. Reprod. Sci.* 86: 297–304.

Yoon KW, Shin TY, Park JI, Roh S, Lim JM, Lee BC, Hwang WS, Lee ES (2000): Development of porcine oocytes from preovulatory follicles of different sizes after maturation in media supplement with follicular fluids. *Reprod. Fertil. Dev.* 12: 133–139.

Yoshida M, Ishizaki Y, Kawagishi K (1990): Blastocyst formation by pig embryos resulting from *in vitro* fertilization of oocytes matured *in vitro*. *J. Reprod. Fertil.* 88: 1–8.

Yoshida M, Ishigaki K, Pursel VG (1992.a): Effect of maturation media on male pronucleus formation in pig oocytes matured *in vitro*. *Mol. Reprod. Dev.* 31: 68–71.

Yoshida M, Ishigaki K, Kawagishi K, Bamba K, Kojima Y (1992.b): Effects of pig follicular fluid on maturation of pig oocytes *in vitro* and on their subsequent fertilizing and developmental capacity *in vitro*. *J. Reprod. Fertil.* 95: 481–488.

Yoshida M, Mizoguchi Y, Ishigaki K, Kojima T, Nagai T (1993.a): Birth of piglets derived from *in vitro* fertilization of pig oocytes matured *in vitro*. Therio. 39: 1301–1311.

Yoshida M, Ishigaki K, Nagai T, Chikyu M, Pursel VG (1993.b): Glutathione concentration during maturation and after fertilization in pig oocytes: relevance to the ability of oocytes to form a male pronucleus. Biol. Reprod. 49: 89–94.

Yoshida M, Cran DG, Pursel VG (1993.c): Confocal and fluorescence microscopic study using lectins of the distribution of cortical granules during the maturation and fertilization of pig oocytes. Mol. Reprod. Dev. 36: 462–468.

Yoshino J, Kojima T, Shimizu M, Tomizuka T (1993): Cryopreservation of porcine blastocysts by vitrification. Cryobiol. 30: 413–422.

Yoshioka K, Suzuki C, Tanaka A, Anas MKI, Iwamura S (2002): Birth of piglets derived from porcine zygotes cultured in a chemically defined medium. Biol. Reprod. 66: 112–119.

Yoshioka K, Suzuki C, Ito S, Kikuchi K, Iwamura S, Rodriguez-Martinez H (2003): Production of piglets derived from *in vitro* produced blastocysts fertilized and cultured in chemically defined media: effects of theophylline, adenosine and cysteine during *in vitro* fertilization. Biol. Reprod. 69: 2092–2099.

Zelenák L, Vadáné Kovács M, Nagy S.-né (2006): Húskészítmények mangalicából. Állatteny. Tak. 55: 277–288.

Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM, (1994): Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. Nat. 372: 425–432.

Zhang D, Pan L, Yang LH, He XK, Huang XY, Sun FZ (2005): Strontium promotes calcium oscillations in mouse meiotic oocytes and early embryos through InsP3 receptors, and requires activation of phospholipase and the synergistic action of InsP3. Hum. Reprod. 20: 3053–3061.

Zheng YS, Fiser P, Sirard MA (1992): The use of ejaculated boar semen after freezing in 2 or 6% glycerol for *in vitro* fertilization of porcine oocytes matured *in vitro*. Therio. 38: 1065–1075.

Zhu J, Telfer EE, Fletcher J, Springbett A, Dobrinsky JR, De Sousa PA, Wilmut I (2002): Improvement of an electrical activation protocol for porcine oocytes. Biol. Reprod. 66: 635–641.

Zsolnai A, Radnóczy L, Fésüs L, Anton I (2006): Molekuláris genetikai módszerek alkalmazásának eredményei a mangalicatenyésztésben. Állatteny. Tak. 55: 224.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

A vizsgálatok elvégzése és a dolgozat elkészítése közben nyújtott szakmai segítségéért, támogatásáért és a külföldi tanulmányutak biztosításáért köszönetet mondok témavezetőmnek, Dr. Bali Papp Ágnesnek.

Köszönöm Dr. Somfai Tamásnak és Rakel Romarnak a kísérletek megtervezésében nyújtott szakmai segítségüket.

Köszönöm a Nyugat–Magyarországi Egyetem, Mezőgazdaság- és Élelmiszertudományi Kar, Állattudományi Intézet munkatársainak PhD–tanulmányaim során nyújtott támogatását.

Köszönettel tartozom a Murciai Állatorvos-tudományi Egyetem, sertésembriók előállításával foglalkozó kutatóinak, hogy biztosították számomra a kísérletekhez szükséges feltételeket, és, hogy megtanítottak a különböző festési eljárásokra. Köszönöm Rakel Romar, Carmen Matas, Pilar Coy, Salvador Ruiz, Joaquín Gadea, Francesco Vazquez, Juan Carlos Gardón szakmai támogatását, kedvességét, barátságát.

A konfokális mikroszkóppal készített képek elkészítésében nyújtott segítségéért külön köszönettel tartozom Rakel Romarnak.

Köszönetemet szeretném kifejezni Luiz Grullónnak, akire spanyolországi munkám során szakmailag és barátilag mindig számíthattam.

Köszönöm Vitinger Emőkének az angol nyelvű tézisek elkészítésében nyújtott segítségét.

A statisztikai vizsgálatok elvégzése során nyújtott segítségüket köszönöm Lőrincz Zsuzsannának, Salamon Ildikónak és Koltai Juditnak.

Végül, de nem utolsó sorban ajánlom ezt az értekezést Szüleimnek, Kedvesemnek és Barátaimnak, akik végtelen türelmükkel, biztatásukkal és szeretetükkel segítették munkámat.