

DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

**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

Készítette

VARGA ERIKA

jelölt

Mosonmagyaróvár

2007

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

COC	Kumuluszsejtekkel körülvett petesejt
CPA	Krioprotektív anyag
CSF	Citosztatikus faktor
CX	Cikloheximid
6-DMAP	6-dimetil-aminopurin
GV	Germinális vezikulum (csírahólyag)
hCG	Humán chorion gonadotropin hormon
IVC	<i>In vitro</i> embriótenyésztés
IVF	<i>In vitro</i> fertilizáció
IVM	<i>In vitro</i> maturáció
IVP	<i>In vitro</i> embrió-előállítás
MPF	Metafázist segítő faktor
NCSU-23	North Carolina State University által kifejlesztett oldat
NCSU-37	North Carolina State University által kifejlesztett oldat
OPS	Nyitott végű műszalma vitrifikációs eljárás
PMSG	Vemhes kanca szérum gonadotropin hormon
PN	Pronukleusz
SrCl₂	Stroncium-klorid
TCM-199	Szövettenyésztő oldat 199
ZP	Zona pellucida

1. CÉLKITŰZÉS

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

Az *in vitro* embrió–előállítás 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); mint például klónozás (Betthausen et al., 2000), transzgénikus sertések előállítása (Brem et al., 1985), xenotranszplantáció (Cascalho et al., 2006).

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

Sertés petesejtek krioprezervációja napjainkban még nem teljesen megoldott, mert a sertés oociták rendkívül érzékenyen reagálnak a hőmérsékletváltozásra és az alkalmazott krioprotektív anyagokra.

Az elmúlt évtizedekben számos új eljárás került kidolgozásra az IVP–rendszer és a krioprezervációs eljárások fejlesztésével kapcsolatban, azonban ezeken a területen a jövőben további kutatások szükségesek.

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 és vitrifikációja, továbbá visszaolvasztást követő *in vitro* termékenyítése és az embriófejlődés vizsgálata.

2. ANYAG ÉS MÓDSZER

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

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

Minden vizsgálat háromszor került ismétlésre.

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

2.1. Sertés petesejtek aktiválása

A kísérletekben vágóhídról származó, nagy fehér fajtacsoportba tartozó, prepuberális sertés petefészkekből nyert kumulusz–petesejt komplexeket (COC) használtunk.

A kinyert COC-eket 42 órán keresztül, TCM-199 oldatban maturáltattuk (IVM), melyet 10 % sertés follikulus–folyadékkal, 0,9 mM Na-piruváttal, 100 μ M ciszteaminnal, 0,25 mM glutaminnal, 0,1 mg/ml sztreptomycin-szulfáttal, illetve az érés első 20 órájában 10 NE/ml hCG-vel és PMSG-vel egészítettünk ki.

Három kísérletsorozatban összesen 2401 petesejtet vizsgáltunk meg.

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 maturáltattuk (42 óra), 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.

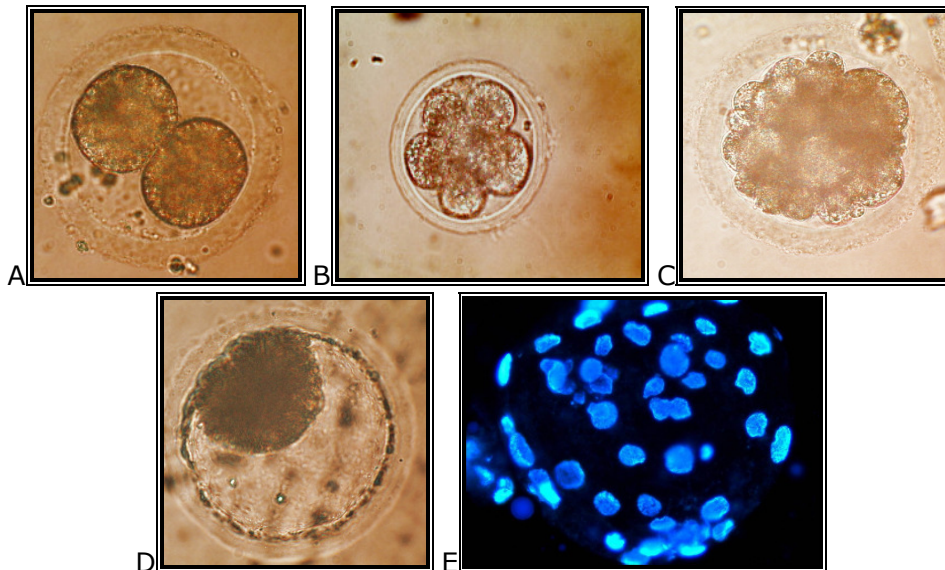
Ezt követően a petesejteket/embriókat ecetsav és etanol 1:3 arányú keverékében fixáltuk, és 0,1 %-os ecetsavas-orceinnel festettük, majd meghatároztuk, az embriófejlődést megkezdett sejtek arányát.

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.



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

2.2. Sertés petesejtek vitrifikációs hűtése

A vizsgálatokban a „nyitott végű műszalma” (OPS) vitrifikációs eljárást (Vajta et al., 1997) alkalmaztuk vágóhídi petefészkekből származó sertés petesejtek fagyasztására/visszaolvasztására.

Két kísérletsorozatban, összesen 2237 petesejtet vizsgáltunk meg.

1. kísérletsorozat

In vitro maturáltatott, kumuluszsejtekkel körülvett [**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.

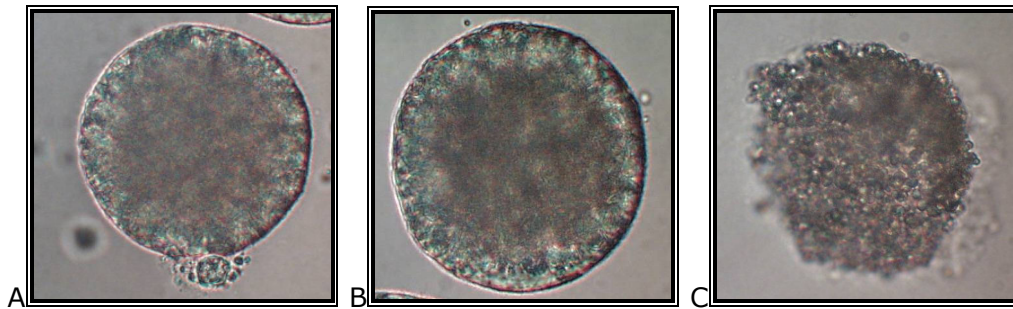
2. kísérletsorozat

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

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

A **kontroll csoportban** (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, továbbá feljegyeztük a termékenyülési arányt a különböző csoportokban.



2. 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]

2.3. Mangalica petesejtek *in vitro* maturáltatása és krioprezervációja

Mangalica petesejtek *in vitro* maturáltatásával és vitrifikációs hűtésével kapcsolatban nem találtunk publikációkat a szakirodalomban.

Három ismétlésben, összesen 658 mangalica és 676 nagy fehér sertés petesejtet fagyasztottunk az OPS eljárással.

A vitrifikációs eljárás során *in vitro* maturáltatott (42 óra), kumuluszsejtekkel körülvevett mangalica (**M-csoport**) és nagy fehér (**NF-csoport**) sertés petesejteket használtunk.

A kontroll csoportokban mangalica (**KM-csoport**) és nagy fehér (**KNF-csoport**) petesejteket maturáltattunk, majd termékenyítettünk.

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 [**M-csoport** (n=171)] és a nagy fehér sertés [**NF-csoport** (n=183)] petesejtek vitrifikációs eljárással szembeni érzékenységét hasonlítottuk össze a visszaolvasztást követő degenerálódási arány alapján.

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. EREDMÉNYEK

3.1. Sertés petesejtek aktiválása

42 h *in vitro* maturációt követően megállapítottuk, hogy a vizsgált (n=90) kumulusz–petesejt komplexek (COC) $93,33 \pm 1,92$ %-a rendelkezett expandálódott kumuluszállománnyal, és a petesejtek $77,78 \pm 1,92$ %-a metafázis II stádiumba jutott.

1. kísérletsorozat eredményei

- A CX–csoportban ($57,3 \pm 1,52$ %) szignifikánsan ($P < 0,05$) nagyobb volt az előmag–képződés (aktiválódás), mint az S–($50,96 \pm 3,72$ %), valamint a D–($45,91 \pm 3,39$ %) és az SD–csoportokban ($47,25 \pm 1,08$ %).
- Az SCX–csoportban ($57,19 \pm 4,5$ %) az aktiválódási ráta szignifikánsan ($P < 0,05$) nagyobb volt, mint az S–($50,96 \pm 3,72$ %), a D–($45,91 \pm 3,39$ %) és az SD–csoportokban ($47,25 \pm 1,08$ %).
- A kezelések petesejtek aktiválódására kifejtett hatása a kontroll csoporthoz képest statisztikailag igazolható; a kezelési csoportok mindegyike szignifikánsan ($P < 0,05$) nagyobb aktiválódást mutatott, mint a kontroll 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: $10,63 \pm 2,42$ %.

2. kísérletsorozat eredményei

- Az aktiválódott petesejtek a kezelési csoportokban 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 aktiválódott, és megkezdte az embriófejlődést, azonban 2–sejtes stádiumban megrekedt.
- A kezelések embriófejlődésre gyakorolt hatása között szignifikáns ($P < 0,05$; $P < 0,001$) különbséget nem tudtunk kimutatni. Megállapítható azonban, hogy a különböző vegyszeres kezelések hatására az egyes csoportokban, a petesejtek legalább 46 %-a fejlődésnek indult.

3. kísérletsorozat eredményei

- Az IVC hatodik napján a különböző kezelési csoportokban az embriók 10–19 %-a megrekedt a 2–sejtes stádiumban. Szignifikáns ($P < 0,05$) különbséget 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 stádiumban, mint az SCX–csoportban ($9,88 \pm 2,42$ %).
- A 4–sejtes embriókat vizsgálva, a kezelési csoportok között nem találtunk szignifikáns ($P < 0,05$ és $P < 0,001$) különbséget.
- 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 ($18,95 \pm 2,47$ %). Az SCX–csoportban ($14,81 \pm 7,55$ %) szignifikánsan ($P < 0,05$) kevesebb 8–sejtes stádiumú embriót jegyeztünk fel, mint a CX–csoportban ($18,95 \pm 2,47$ %).
- Morula embriókat vizsgálva, a különböző csoportokban nem találtunk statisztikailag igazolható különbségeket.
- A kezelések szignifikáns ($P < 0,05$) hatást gyakoroltak a blasztociszták fejlődésére. Blasztociszta embriókat az S–, CX– és az SCX–csoportokban tudtunk megfigyelni. Az SCX–csoportban ($25,93 \pm 4,26$ %) és a CX–csoportban ($18,95 \pm 2,47$ %) szignifikánsan ($P < 0,05$) több blasztocisztát tapasztaltunk, 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 ($18,95 \pm 2,47$ %).

3.2. Sertés petesejtek vitrifikációs hűtése

1. kísérletsorozat eredményei

- 42 óra IVM-t követően a vizsgált ($n=75$) kumulusz–petesejt komplexek (COC) $89,33 \pm 6,11$ %-a rendelkezett expandálódott kumuluszállománnyal, és a petesejtek $82,67 \pm 6,11$ %-a metafázis II stádiumba jutott.
- A CS–csoportban ($78,08 \pm 1,88$ %) a petesejtek szignifikánsan ($P < 0,05$) nagyobb hányada degenerálódott a vitrifikációs eljárás során, mint a K–csoportban ($57,04 \pm 1,55$ %).
- 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).
- A kontroll csoportban (93,33±6,67 %), a visszaolvasztást követően szignifikánsan (P<0,05) nagyobb arányban rendelkeztek a petesejtek intakt plazmamembránnal, mint a K-csoportban (68,89±10,18 %) és a CS-csoportban (60±6,67 %).
- A fagyasztott/visszaolvasztott petesejtek szignifikánsan (P<0,05) kisebb hányada (K-csoport: 36,63±4,64 %; CS-csoport: 19,66±4,78 %) termékenyült, a kontroll csoporthoz képest (57,89±3,13 %). Ugyanakkor szignifikáns (P<0,05) különbség volt a K-csoport (36,63±4,64 %) és a CS-csoport (19,66±4,78 %) fertilizációs rátája között is.

2. kísérletsorozat eredményei

- Petesejtek vitrifikációs eljárást megelőző maturációja szignifikánsan (P<0,05) jobb hatásfokú volt, mint a fagyasztott/visszaolvasztott petesejtek maturációja.
- A visszaolvasztást követően a GK-csoporthoz (78,57±2,04 %) és a GCS-csoporthoz (85,71±1,31 %) képest, az MK-csoportban (62,5±3,63 %) szignifikánsan (P<0,05) kisebb arányban degenerálódtak a petesejtek a vitrifikációs eljárás során – szintén szignifikáns (P<0,05) különbség figyelhető meg a GK-és a GCS-csoportok között.
- A kontroll csoportban (51,83±3,55 %), a többi csoporthoz képest nagyobb arányban termékenyültek a petesejtek, illetve az MK-csoportban (35,73±2,15 %) szintén több oocita termékenyült, mint a GK-csoportban (13,33±2,89 %) és a GCS-csoportban (9,4±0,96 %).

3.3. Mangalica petesejtek *in vitro* maturáltatása és krioprezervációja

1. kísérletsorozat eredményei

- Az alkalmazott maturációs módszer alkalmasnak bizonyult vágóhídi mangalica petefészkekből származó, éretlen mangalica petesejtek *in vitro* maturáltatására.
- A 42 órás IVM során, a NF-csoportban (87,63±2,13 %) szignifikánsan (P<0,05) nagyobb volt a kumuluszsejtek expandálódási aránya, mint a M-csoportban (82,99±2,32 %).

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

2. kísérletsorozat eredményei

- Az eredmények alapján úgy tűnik, 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 ($P < 0,05$) nagyobb petesejt-degenerálódásban nyilvánult meg. 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 ($69,95 \pm 3,91$ %).

3. kísérletsorozat eredményei

- A fagyasztott/visszaolvasztott petesejtek, a termékenyítést követően, 50 %-nál nagyobb arányban kezdték meg a fejlődést (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 ($P < 0,05$) alacsonyabb volt a fejlődésnek indult sejtek száma, mint a kontroll NF-csoportban.
- A csoportokban megfigyelt fejlődési stádiumok között szignifikáns ($P < 0,05$) különbséget nem tapasztaltunk.
- Morula embriókat a mangalica esetében (az IVC 4. napján) csak a kontroll csoportban tudtunk megfigyelni ($16,72 \pm 4,8$ %).

4. ÚJ, Tudományos Eredmények

4.1. Sertés petesejtek aktiválása

- Minden egyéb elő-kezelés nélkül alkalmazott stroncium-klorid, 6-dimetil-aminopurin, cikloheximid, illetve ezeknek a vegyületeknek a 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 %).

4.2. Sertés petesejtek vitrifikációs hűtése

- 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.

4.3. 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” vitrifikációs eljárással fagyasztott mangalica petesejtek több mint 50 %-a megkezdte az embrionális fejlődést az *in vitro* termékenyítést követően.

5. JAVASLATOK

5.1. Sertés petesejtek aktiválása

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

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).

In vivo körülmények között a petesejtbe jutó spermium az oocita aktiválódását és a meiózis folytatását eredményezi.

Az aktiválás történhet a petesejtek elektromos stimulációjával és vegyszeres 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.

5.2. Sertés petesejtek krioprezervációja

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).

Vizsgálatainkban megállapítható, 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 javasoljuk.

Jelenleg a legtöbb petesejt–vitrifikációs kutatás az érett (M-II) oocitákra fókuszál. 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.

Az eredmények alapján – a meiotikus orsó érzékenysége ellenére – *in vitro* maturáltatott petesejtek használatát javasoljuk sertés petesejtek vitrifikációs hűtésekor. A GV-stádiumú petesejtek fagyasztásakor szignifikánsan magasabb petesejt–degenerálódást és alacsonyabb termékenyülési arányt mutattak, mint a M-II petesejtek. Valószínű, hogy a csírahólyag állapotú petesejtek kevésbé permeábilisak az etilén-glikollal szemben, így a krioprotektív anyag nem tudja kifejteni védő hatását az eljárás során.

5.3. Mangalica petesejtek maturáltatása és krioprezervációja

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 fajon között, hanem fajon belül is változó.

Az eredmények javítása érdekében tervezzük citohalazin-B kezelés alkalmazását a fagyasztás előtt – ezzel növelve a mangalica petesejtek hűtéssel szembeni toleranciáját.

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



3. kép: Mangalica koca malacaival

6. HIVATKOZÁSOK

Aman RR, 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.

Betthausen J, Forsberg E, Augenstein M, Childs L, Eilertsen K, Enos J, Forsythe T, Gloueke P, Jurgella G, Koppang R, Lesmeister T, Mallon K, Mell G, Misica P, Pace M, Pfister-Genskow M, Strelchenko N, Voelker G, Watt S, Thompson S, Bishop M (2000): Production of cloned pigs from *in vitro* systems. Nat. Biotech. 18: 1055–1059.

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*

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.

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

Fraser LR (1987): Strontium supports capacitation and the acrosome reaction in mouse sperm and rapidly activates mouse eggs. Gamete Res. 18: 363–374.

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

Lee WJ, Tian CX, Yang X (2004): Optimization of parthenogenetic activation protocol in porcine. Mol. Reprod. Dev. 68: 51–57.

Macháty Z, Funahashi H, Mayes MA, Day BN (1996): Effects of injecting calcium chloride into *in vitro* matured porcine oocytes. Biol. Reprod. 54: 316–322.

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.

Nussbaum DJ, Prather RS (1995): Differential effects of protein synthesis inhibitors on porcine oocyte activation. Mol. Reprod. Dev. 41: 70–75.

Ozil JP, Huneau D (2001): Activation of rabbit oocytes: the important of the Ca²⁺ signal regime on development. Dev. 128: 917–928.

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: 31th Int. Congr. Anim. Reprod. 3: 15–19.

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.

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.

Wang WH, Macháty Z, Abeydera LR, Prather RS, Day BN (1998): Parthenogenetic activation of pig oocytes with Ca-ionophore and the block to sperm penetration after activation. Biol. Reprod. 58: 1357–1366.

7. A DOLGOZAT TÉMÁJÁBAN MEGJELENT PUBLIKÁCIÓK

7.1. Lektorált lapokban megjelent tudományos közlemények

- **Varga E, Makkosné Petz B, Gajdócsi E, Salamon I, Bali Papp Á (2007):** Vitrification of *in vitro* matured oocytes of Mangalica (Hungarian native pig breed) and Large White pig. *Acta Veterinaria Hungarica. Beadva.*
- **Varga E, Lőrincz Zs, Koltai J, Bali Papp Á (2007):** Parthenogenetic development of *in vitro* matured porcine oocytes treated with chemical agents. *Animal Reproduction Science.* [IF: 2,18]. *Megjelenés alatt.*
- **Varga E, Gardón JC, Bali Papp Á (2006):** Effect of Open Pulled Straw (OPS) vitrification on the fertilization ability and developmental competence of porcine oocytes. *Acta Veterinaria Hungarica.* 54: 107–116. [IF: 0,535]
- **Varga E, Matas C, Ruíz S, Bali Papp Á (2006):** Sertés petesejtek vitrifikálása nyitott végű műszalma eljárással. *Állattenyésztés és Takarmányozás.* 55: 475–481.
- **Bali Papp Á, 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. *Acta Veterinaria Hungarica.* 53: 91–101. [IF: 0,535]
- **Bali Papp Á, Varga E, Kiss V (2004):** Sertés embriók mélyhűtésének lehetőségei. *Állattenyésztés és Takarmányozás.* 53: 167–168.

7.2. Lektorált lapokban megjelent összefoglalók

- **Varga E, Romar R, Garcia-Vazquez FA, Coy P, Bali Papp A, Grullón L, Ruiz S, Matas C (2007):** Influence of the vitrification procedure on zona pellucida solubility in pig oocytes. *Reproduction in Domestic Animals.* 42: 77. [IF: 1,503]
- **Matás C, Garcia-Vázquez F, Varga E, Gadea J, Coy P, Ruiz S (2006):** Sperm source and sperm treatment affect the IVF yield in pigs. *Reproduction in Domestic Animals.* 41: 299. [IF: 1,503]
- **Bali Papp Á, Varga E (2006):** Chemical activation of *in vitro* matured porcine oocytes. *Reproduction Fertility and Development.* 18: 263–264. [IF: 2,542]
- **Gardón JC, Varga E, Rita M, Földes F, Bali Papp Á (2005):** Morphological classification of the ovaries in relation to the fertilization ability and the rate of polyspermy of *in vitro* fertilized

bovine oocytes. *Reproduction in Domestic Animals*. 40: 373. [IF: 1,503]

- **Bali Papp Á, Somfai T, Varga E, Marosán M (2005):** Survival of porcine oocytes at germinal vesicle stage after vitrification with Open Pulled Straw method. *Reproduction Fertility and Development*. 17: 189. [IF: 1,515]

7.3. Előadások

- **Varga E (2007):** Master Program. „Biology and technology of reproduction in domestic animals”. Cryopreservation of gametes and embryos in domestic animals. Murcia, Spain, 22 Jan–2 Febr.
- **Varga E (2006):** Master Program. „Biology and technology of reproduction”: Preservation of gametes and embryos in domestic animals. Murcia, Spain. 13–17 March.
- **Varga E, Bali Papp Á (2006):** Néhány biotechnológiai módszer a sertésnemesítésben. XIII. Szaporodásbiológia Találkozó: „Az állattenyésztés szaporodásbiológiai vonatkozásai”. Budapest, június 26–27.
- **Varga E, Gajdócsi E, Bali Papp Á (2006):** Különböző fajtájú sertés petesejtek vitrifikációs hűtése, visszaolvasztás utáni fertilizációja és az embriók fejlődése. Állatbiotechnológiai kutatások Magyarországon. Budapest, MTA Székház, szeptember 29.
- **Bali Papp Á, Varga E (2005):** Sertés petesejtek vitrifikálása nyitott végű műszalma (OPS) eljárással. XII. Szaporodásbiológia Találkozó: „Szaporodásbiológiai gondozás a fenntartható állattenyésztésben”. Hajdúszoboszló, november 4–5.

7.4. Konferencia-kiadványokban megjelent közlemények

- **Varga E (2006):** Mangalica sertés génmegőrzésének egyik lehetséges útja: a vitrifikációs hűtés. XII. Nemzetközi Környezetvédelmi és Vidékfejlesztési Diákkonferencia, Mezőtúr, július 5–7.
- **Varga E, Gajdócsi E, Bali Papp Á (2006):** *In vitro* maturált sertés petesejtek aktiválása. XXXI. Óvári Tudományos Nap: „Élelmiszer-alapanyag előállítás - Quo vadis?”. Mosonmagyaróvár, október 6.
- **Varga E, Gardón JC, Bali Papp Á (2005):** Effect of Open Pulled Straw (OPS) vitrification on fertilization ability and developmental competence of *in vitro* matured and immature denuded or cumulus covered porcine oocytes. 21th Scientific meeting of European Embryo Transfer Association. Keszthely, Hungary. 9–10 Sept.

- **Bali Papp Á, Varga E, Kiss V (2004):** Sertésembriók vitrifikációs hűtése XXX. Óvári Tudományos Napok: „Agrártermelés – harmóniában a természettel”. Mosonmagyaróvár, október 7.
- **Varga E, Somfai T, Tartaglione M, Gardón JC, Bali Papp Á (2004):** Az idegnövekedési faktor hatása sertés petesejtek meiotikus osztódására az *in vitro* érlelés során. XXX. Óvári Tudományos Napok: „Agrártermelés – harmóniában a természettel”. Mosonmagyaróvár, október 7.
- **Bali Papp Á, Somfai T, Varga E, Tartaglione M, Gardón JC (2004):** How can influence nerve growth factor the *in vitro* maturation of pig oocytes 15th International Congress on Animal Reproduction. Porto Seguro, Brazil. 8–12 August.
- **Bali Papp Á, Makkosné Petz B, Varga E (2003):** Evaluation of boar semen quality by different staining methods. 15th European A.I. Vets Meeting. Budapest, október 8–11.