

DEBRECENI EGYETEM
AGRÁRTUDOMÁNYI CENTRUM
MEZŐGAZDASÁGTUDOMÁNYI KAR
ÁLLATTENYÉSZTÉSTANI ÉS TAKARMÁNYOZÁSTANI TANSZÉK

ÁLLATTENYÉSZTÉSI TUDOMÁNYOK DOKTORI ISKOLA

Doktori Iskola vezető: Dr. Bánszki Tamás MTA doktora

„DOKTORI (PHD) ÉRTEKEZÉS TÉZISEI”

**AZ *IN VITRO* EMBRIÓ-ELŐÁLLÍTÁS ÉS EMBRIÓBIOPSZIA
ALKALMAZÁSÁNAK LEHETŐSÉGE A SZARVASMARHATENYÉSZTÉSSEN.**

Készítette:

Bodó Szilárd

Témavezetők:

Dr. Gócza Elen PhD

Dr. Jávora András CSc

Debrecen

2003

A KUTATÁS CÉLKITŰZÉSEI

Doktori értekezésemben az állattenyésztési alkalmazhatóság hangsúlyozásával alkalmazott szaporodásbiológiai módszereket ismertetek. Bemutatok egy szarvasmarha embriók *in vitro* előállításához kidolgozott laboratóriumi eljárást, és az embriók beültetés előtti genetikai vizsgálata számára kifejlesztett embrióbiopsziás protokollt. Végül a mikromanipulációs beavatkozás egérmodellen tanulmányozott, embrió- és magzatfejlődésre gyakorolt hatásának vizsgálati eredményeit ismertetem.

1. Megbízható *in vitro* szarvasmahaembrió-előállító technológia rendszerbe állítása

Célom egy olyan technológiai protokoll kialakítása volt, amely alkalmas arra, hogy rutinszerűen, különböző felhasználási igények kielégítése számára, szarvasmarha embriókat hozzon létre *in vitro*.

- Az *in vitro* embriók előállíthatók az alap kutatás számára: preimplantációs embriófejlődési vizsgálatokban, embriómélyhűtési, és klónozási kísérletekben szerepelhetnek kísérleti objektumként.
- Az embrió-előállító rendszer a MOET tenyésztési eljárás technológiai elemeként is alkalmazható: nagy tenyészértékű donoroktól származó petesejtek *in vitro* termékenyítésével beültetésre alkalmas embriók hozhatók segítségével létre.
- Az *in vitro* embrió-előállítás szolgálhat génmegőrzési célokat is. Levágott üszők és tehének petefészkéből származó petesejtek *in vitro* termékenyítésével „*post mortem*” létrehozott embriók mélyhűthetők. Az *ex situ* génmegőrzést szolgáló embrióbank biztosíthatja egy veszélyeztetett fajta genetikai változatosságát. A létrehozott embriók hordozzák a nőivar genetikai örökségét is, segítségükkel egy kis létszámú *in situ* génrezerv állományban bekövetkező generáció ellen lehet védekezni.
- A mesterséges termékenyítés gyakorlatában a termékenyítőanyag morfológiai és fiziológiai tulajdonságainak jellemzésén kívül a petesejtek termékenyítésével az *in vitro* termékenyítőképesség is megállapítható, így az *in vitro* fertilizációs eljárást, mint mérési rendszert, spermaminták funkcionális értékelésére is felhasználható.

A dolgozatban bemutatott kísérleteket az alkalmazási területek szerint ismerttettem.

Génmegőrzési célú felhasználás

- A rendszer génmegőrzési célú alkalmazásához a petesejtek kinyerésének hatékonyságát vizsgáltam levágott magyar szürke szarvasmarha üszők és tehének petefészkének felhasználásával.
- Az embrió-előállító rendszer hatékonyságának növelése céljából az *in vitro* termékenyítést követő *in vitro* embriótenyésztés során alkalmazott tenyésztőoldat megváltoztatásának hatását tanulmányoztam.

Az *in vitro* termékenyítés módszereinek felhasználása a termékenyítőanyag funkcionális jellemzéséhez

- A termékenyítő anyag *in vitro* jellemzésére a hímivarsejtek motilitásának mérésével *in vitro* fertilizáció során alkalmazott felúsztatási eljárás motilitásra gyakorolt pozitív szelekciós hatását elemeztem.
- A felúsztatási teszt segítségével közvetve igazolni kívántam azt a feltételezést, hogy a Kovács-Foote festés szerint élők és ép akroszómájúnak látszó, de farokfestődést mutató hímivarsejtek csökkent motilitással rendelkeznek.
- Az *in vitro* fertilizáció segítségével összefüggést kerestem a hímivarsejtek motilitása és *in vitro* termékenyítőképessége között.

In vitro létrehozott embriók alkalmazott kutatási célú felhasználása

- Szarvasmarha embriók preimplantációs genetikai diagnózisának kidolgozásához az *in vitro* létrehozott embriókon az embrióbiopszia *in vitro* fejlődésre gyakorolt hatását vizsgáltam.

Nagy értékű embriók *in vitro* előállítása a gyakorlat számára

- MOET nukleusztenyésztési eljárás részeként élő üszökből és előhasi üszökből ovum pick up-pal kinyert petesejtek termékenyítésével nagy értékű embriókat hoztam létre, majd nőivarú embriókat az embriószexálást követően recipiens állatokba ültettük.

2. A preimplantációs genetikai diagnózis embrióbiopszia módszerének kidolgozása, embrió és magzatfejlődésre gyakorolt hatásának vizsgálata

Az embriók, recipiens állatba való beültetésük előtt, genetikai vizsgálatnak vethetők alá. A mikromanipulációval kinyert sejtek genetikai analízisével (FISH, PCR) az embrió ivarát, terheltségeket, és értékmérő tulajdonságokat meghatározó géneket lehet genotípezni, a beültetésre váró embriót jellemezve.

Kísérleteimben preimplantációs korú, a kompaktálódást megelőző fejlettségű *in vitro* létrehozott szarvasmarha és egér embriók részére dolgoztam ki embrióbiopsziás eljárásokat.

Szarvasmarha embriók biopsziája

- Célom olyan embrióbiopsziás protokoll kidolgozása volt, ami a preimplantációs genetikai diagnózis módszereként alkalmas 8-16 sejtes *in vitro* létrehozott szarvasmarha embriók hatékony mikromanipulációjára és a gyakorlatban is alkalmazható.

Kísérletek egérmodellen

- Az embrióknak, a beavatkozást követő, *in vitro*, majd *in utero* továbbfejlődését megfigyelve, az embrióbiopszia esetleges embrió- és magzat károsító hatását vizsgáltam egérmodellen.
- A megfigyelések számára egy új, hatékony, gyorsan és egyszerűen kivitelezhető embrióbiopsziás eljárást kellett kifejlesztenem, amely a gyakorlatban mind egér, mind humán embriók esetén felhasználható.
- Az egérmodellen az embriók *in vitro* tenyésztése során tapasztalható fejlődési rendellenességeket össze kívántam vetni a biopszázott szarvasmarha embriók *in vitro* fejlődésekor megfigyelt jelenségekkel.

A KUTATÁS ELŐZMÉNYEI

1. *In vitro* szarvasmahaembrió-előállító technológia

1981-ben született meg az első *in vitro* termékenyítéssel létrehozott borjú. A kísérlet során az ovulációt követően a petevezetőből kimosott petesejteket termékenyítettek friss bikaspermával, majd az embriókat, a fejlődés korai szakaszában, sebési úton recipiens állatok petevezetőjébe ültették. A donor és recipiens állatokat egyaránt terhelő, körülményes sebészeti beavatkozás miatt húsz évvel ezelőtt az eljárás még nem kínált egyszerű alternatívát az akkor már megbízhatóan, egyszerűbb és főleg olcsóbb vértelen beavatkozással végrehajtható MOET technológiához képest. Az *in vitro* embrió-előállítás csak a petesejtek kinyerésének egyszerűsítésével, a petesejtek mennyiségének és a termékenyítés hatékonyságának növelésével, egy megbízhatóan, hatékonyan és olcsón működtethető embriótenyésztő rendszer kidolgozásával válhatott csak versenyképessé. A kilencvenes évek óta tartó fejlesztés célja minőségében a MOET embriókkal megegyező, de előállítási költségeit tekintve olcsóbb embriók előállítása.

Az *in vitro* embrió-előállítási technológia hatékonysága az egyes technológiai lépések eredményességének növelésével javítható. A később termékenyítésre kerülő petesejtek egyaránt származhatnak élő és levágott állatok petefészkeiből. A tüszőfolyadékban található, kumulusz sejtekkel körülvett, éretlen petesejtekhez a petefészkek preantrális tüszőinek aspirálásával juthatunk hozzá. *In vitro* csak a meiózis második metafázisában levő, első sarki testet is hordozó petesejtek termékenyíthetők sikeresen. A petesejtek egy napos *in vitro* érlelést követően érik el a természetes ovulációnál megfigyelhető fejlettséget. A termékenyítés előtt a felolvasztott termékenyítőanyagot különböző előkezelési eljárások (spermamosás, felülúsztatás, Percoll gradiensen való centrifugálás) segítségével meg kell szabadítani a spermahígítótól. A petesejtekről a 22-24 órás, termékenyítőoldatban történő inszemináció után a petesejteket körülvévő tápláló kumuluszsejtek eltávolíthatók. A zigótákból *in vitro* tenyésztőfolyadékban egy hét alatt fejlődnek ki a beültetésre alkalmas fejlettségű hólyagcsírák.

2. Preimplantációs genetikai diagnózis

A korai embriófejlődés szakaszában, az emlős embriók mikromanipulációval történő darabolása (felezés, negyedelés) után az embriódarabok képesek regenerálódni, és belőlük a beültetést követően életképes magzat fejlődik. A kompaktálódást megelőző embriófejlődési szakaszban (4-16 sejtű embriók) néhány embrionális sejt, ún. blasztomer mikromanipulációval való eltávolítása sem befolyásolja jelentősen az embriófejlődést. Megfigyelések szerint a beavatkozás után megmaradó sejtek totipotenciájuknál fogva képesek pótolni az eltávolított sejteket, átvállalva szerepüket. Az eltávolított sejtek genetikailag elemezhetők, így az embrió, még az implantációt megelőzően genetikailag jellemezhető. A blasztomerek eltávolítására több mikromanipulációs lehetőség is adódik. Az embriófelezés számára kifejlesztett darabolási technika mikropenge, illetve üvegkapillárisból készített üvegtű segítségével végezhető el. A zona pellucida elmetésése után, a későbbi magzati méhlepényt képző, trofektoderma sejtek egy részét (az eredeti embrió térfogatának 10-30%-át) lehet a hólyagszírákból eltávolítani. A mikromanipuláció során az embriócsomó, amiből később a magzat fejlődik, épen marad. Az embriócsomót tartalmazó embrió rész recipiens állatokba ültethető. A mikroaspiációs technika során kompaktálódást megelőző embriófejlődési stádiumú embriókból 1-3 blasztomer nyerhető ki a zona pellucidán ejtett szűk, 30 µm átmérőjű nyíláson keresztül, mikromanipulátorral vezérelt aspirátor kapilláris segítségével.

Az embrióbiopsziával eltávolított blasztomerek FISH, vagy PCR analízisével az embriók ivarán kívül egyes nagyhatású, értékes termelési tulajdonságot meghatározó géneket (pl. kappa-kazein) is lehet genotipizálni. Az embriók örökletes terheltségének (BLAD, DUMPS, citrullinémia, miofoszforiláz deficiencia, alfa-mannozidózis) kimutatására is lehetőség van.

A KUTATÁS MÓDSZEREI

1. Az *in vitro* szarvasmarha -embrió-előállítás módszerei

1.1. Petesejtek kinyerése

A vágási folyamatot a belsősegek eltávolításáig végigkövetve, a petefészkeket a fűszám alapján egyedileg elkülönítve távolítottam el. A szerveket, testmeleg fiziológiás sóoldatban való átmosás után, a testhőmérséklet fenntartása mellett, PBS-oldatban szállítottam a laboratóriumba. Az első állat levágásának kezdetétől a petesejtek leszívásig három óra telt el. A petefészkek felszínén található 2-6 mm átmérőjű folliculusokból a tűszőfolyadékot 10 ml-es fecskendőre szerelt 18 G-s Luer tűvel szívtam le. A petefészkekről hosszmeretet vettem fel. A petesejteket petefészkenként elkülönítve 3,5 cm átmérőjű Petri-csészékben, TALP-HEPES mosófolyadékba gyűjtöttem és számoltam le.

1.2. Petesejtek *in vitro* érlelése

A kumulusszal borított petesejteket (30-40 petesejt/400 μ l) 24 órán keresztül TCM199+2 μ g/ml FSH, 1 μ g/ml E₂, 10 ng/ml EGF+10%FCS érlelőfolyadékban inkubáltam 5%CO₂, 98%-os relatív páratartalom mellett, 38,5 °C-on.

1.3. Érett petesejtek *in vitro* termékenyítése

A petesejtek termékenyítése előtt a műszalmákat 37°C-on egy percig tartó melegítéssel olvasztottam fel, majd a termékenyítőanyagot spermamosással, vagy felúsztatási módszerrel megszabadítottam a spermahígítótól.

Spermamosás

A műszalma tartalmát 38,5 °C hőmérsékletű Sperm-TALP médiumban 4 ml-re hígítottam, majd a tíz percig 300g-n történő centrifugálás a hímivarsejteket a 10 ml-es műanyag centrifugacső aljára ülepítette. A hígítót tartalmazó felülúszót a csapadékról automata pipettával távolítottam el, a csapadékot friss Sperm-TALP hozzáadásával újra hígítottam, majd megismételtem a centrifugálást. A felülúszó eltávolítása után a cső aljában a műszalmában található összes hímivarsejt megtalálható volt.

Felúsztatási eljárás

A termékenyítőanyag minőségének javítása érdekében, a spermahígítótól való megszabadítás mellett, motilitásszelekciós eljárások segítségével, a motilitis sejtek kiválogathatók és koncentrálnak.

A felúsztatási (swim up) módszer során egy felolvasztott műszalma tartalmát 1 ml-nyi Sperm-TALP médium alá rétegezzük. Hatvan percig tartó inkubáció során a motilis hímivarsejtek a médiumba úsznak, egy motilis sejtekből álló frakciót kialakítva. A hígító és a halott, mozgásképtelen sejtek többsége az alárétegzett mintában marad. A felülúszóból 770 µl-t eltávolítunk, és új centrifugacsőben 3 ml Sperm-TALP médiummal hígítjuk. 10 perc 300 g-n történő centrifugálás után 50-100 µl-t meghagyva a felülúszót eltávolítjuk, és a motilis spermafrakciót a maradék médiumban felkeverjük.

A termékenyítőanyag minősítése

A termékenyítőanyag minőségét a sejtek mozgékonyságának mérésével, és fénymikroszkópos festéssel is meghatározhatjuk.

A motilitást HTM Motility Analyzer automata mozgékonyágmérő-műszerrel vizsgáltam. A berendezés a mozgó spermiumokat a mozgás jellege alapján két kategóriába sorolja, megkülönböztetve a nagy motilitású hímivarsejteket (sperm of high motility - HMOT, $v > 50 \mu\text{s/s}$), és az alacsony motilitású hímivarsejteket (sperm of low motility - LMOT, $v < 50 \mu\text{s/s}$). A két csoport összegzésével megállapítja az összes motilis sejt (sum motility - SMOT), és az álló sejtek (static sperm - STAT) arányát. A program meghatározza az egyenes előrehaladó mozgást végző sejtek arányát (straightness of sperm - STRT), és az átlagos progresszív előrehaladási sebességet (mean progressive velocity - VEL) is.

A sejtek fénymikroszkópos bírálatához a Kovács-Foote féle tripán kék/Giemsa festést használtam fel. A festés egyszerre alkalmas a sejtek élő/holt állapotának, a sejtek membránépségének kimutatására a spermium fej posztakroszomális részének tripán kék festődése alapján és az akroszóma épségének jellemzésére a Giemsa festődés alapján. A hímivarsejteket festődésük szerint hét nagyobb csoportba sorolhatjuk. Az élő sejtek akroszómája lehet ép (ÉÉ), lehet ép az akroszóma, de a fark festődő (ÉF), az akroszóma lehet fellazult, vagy sérült (ÉS), és hiányozhat is (ÉN). A halott sejtek akroszómája is lehet ép (HÉ), sérült, vagy fellazult (HS), illetve hiányozhat (HN) is.

A Kovács-Foote festés értékelését végző szakemberek részére egy DOS, illetve Windows operációs rendszerben futtatható számítógépes adatbeviteli programot készítettünk.

A szoftver a mikroszkóp mellé helyezett számítógép billentyűzetének NumPad – számkarakter input egységének billentyűihez rendeli a festés különböző kategóriáit, így a számlálást végző operátor a megfelelő billentyű lenyomásával tárolhatja el a megfigyelt sejtek festési adatait, amit a számítógép hangjelzéssel jelez vissza számára (minden kategóriához külön hang tartozik). A számlálás aktuális állása a számítógép monitorján folyamatosan követhető. A program DOS változata akár kis teljesítményű számítógépeken (286-AT) is futtatható. A számlálás eredményeit összesíti, átlagolja, és kiszámítja a szórásértékeket. Mindkét program az eredményeket az Excel táblázatkezelő program számára, a szükséges fájlkonverziós beállítások segítségével könnyen importálható, txt kiterjesztésű eredménytáblázatba menti ki. A programokhoz készített használati útmutató tájékoztat a programok kezeléséről, az adatok betáplálási és mentési eljárásáról, valamint ismerteti a Kovács-Foote festés módszerét. A szoftverek angol és magyarnyelvű változatát is elkészítettük, amik az Internetről, a <http://sperm.abc.hu> információs web-site-ről ingyenesen letölthetők.

In vitro termékenyítés

Az érlelt petesejteket az előkezelt termékenyítőanyaggal $1 \cdot 10^6$ spermium/ml koncentrációban 22 órán keresztül $20 \mu\text{g/ml}$ heparinnal kiegészített IVF-TALP médiumban 39°C -on, 5% CO_2 -ben termékenyítettem.

1.4. *In vitro* embriótenyésztés

A gaméták koinkubációja után a kumulusszal körülvevett, termékenyített petesejteket $80 \mu\text{l}$ -nyi $38,5^\circ\text{C}$ hőmérsékletű TALP-HEPES mosó folyadékot tartalmazó $1,5 \text{ ml}$ -es steril Eppendorf csöbe raktam, majd másfél percig tartó vortexeléssel eltávolítottam a zigóták zona pellucidájához tapadó kumuluszsejteket. A megtisztított embriókat háromszor TALP-HEPES cseppeken, majd a tenyésztőmédiumból készített mosócseppen keresztül öblítettem át, mielőtt az előzőleg ekvilibrált tenyésztőkultúrába helyeztem volna. Az embriótenyésztéshez kétféle tápfolyadékot használtam fel. TCM 199 alpmédium használatakor 10% FCS-sel egészítettem ki az oldatot. Ebben a rendszerben az embriók fejlődésének serkentésére, elősegítésére az egy-rétegben letapadó, a vortexelésnél leválasztott kumuluszsejtekből társejt-kultúrát alakítottam ki a tenyésztőedény alján. Az embriókat 5% CO_2 , 98%-os relatív páratartalom mellett, $38,5^\circ\text{C}$ -on tenyésztettem. SOF alpmédium használatakor az oldatot esszenciális, és nem esszenciális aminosavakkal, citráttal és mioinozitolal, és 5% FCS-sel egészítettem ki. Az embriókat mobil inkubátorkamrákban csökkentett, 5% O_2 koncentráció mellett tenyésztettem

7-10 napig. A termékenyítés sikerességét az embriótenyésztés harmadik napján (d3) az osztódási % (osztódott embriók/termékenyített petesejtek*100) alapján határoztam meg. Az embriótenyésztés hatékonyságát a tenyésztés hetedik, nyolcadik (d7, d8) napján a termékenyített petesejtszámhoz viszonyított blasztociszta aránnyal jellemeztem.

2. A preimplantációs genetikai diagnózis módszerei

2.1. *In vitro* előállított szarvasmarha embriók biopsziája

Kísérleteimben 8-16 sejtés, *in vitro* előállított szarvasmarha embriók számára mechanikus zona penetrációt követő mikroaspirációt alkalmazó biopsziás módszert dolgoztam ki.

Kapilláris készítés

A mikroaspirációs kapillárist a kapilláris húzást követő mikroköszörüléssel alakítottam ki, majd a mikrohuta üveggyöngyének felhasználásával szűrőtüskét hoztam létre rajta.

Az embriók preinkubációja

Az embriókat 20 percen keresztül 38,5°C-os pH 7,2 kémhatású Ca^{2+} és Mg^{2+} mentes PBS+1mg/ml PVA oldatban inkubáltam a sejtek közötti szoros kapcsolatok fellazításának érdekében.

A biopszia lépései

A preinkubációt követően a mikromanipulációt TALP-HEPES médiumban, 3,5 cm átmérőjű műanyag Petri csésze fedélből kialakított mikromanipulációs edényben végeztem Leitz mikromanipulátorokkal felszerelt Leitz, illetve Narishige mikromanipulátorokkal felszerelt Olympus inverz mikroszkópokon. Az embriót a holder kapillárisal rögzítettem, majd a zona pellucidát az aspirátor kapillárisal döftem át. A blasztomert a kapilláris üregébe szívva távolítottam el.

In vitro embriótenyésztés

A mikromanipuláció után egyedileg, 10 µl-es mikrocseppekben a blasztociszta állapot eléréséig, vagy csak a genetikai vizsgálat végéig tenyésztettem tovább az embriókat *in vitro*.

2.2. Az embrióbiopszia vizsgálata egérmodellen

Az embriók előállítása és in vitro tenyésztése

6-8 hetes életkorú C57Bl6/CBA F1 nőtény egereket 5 IU PMSG-vel, majd 46 órával később 5 IU hCG-vel beoltva szuperovuláltattunk. A C57Bl6/CBA F1 hímekkel párosztatott nőtényeket a termékenyítést követő második napon, cervikális diszlokációval öltük meg. Az eltávolított petevezetőből kimosott embriókat M16 médiumban egy napig, a nyolc-sejtes fejlettségi állapot elérésig széndioxid termosztátban, 37°C hőmérséklet, 98% relatív páratartalom, 5% CO₂-t tartalmazó gázelegyben tenyésztettem tovább.

Az embrióbiopszia módszere, kapilláris készítés

Az általam kidolgozott új mikromanipulációs eljárás során a kompaktalódás előtti embriók zona pellucidáján savas emésztéssel (zona drilling) hozható létre nyílás, amin keresztül a blasztomer a holder kapilláris segítségével eltávolítható.

A holder és drilling kapillárisokat boroszilikát üvegsövekből horizontális kapilláris húzó segítségével állítottam elő. A holder kapillárishoz mikrohuta platinaszálára olvasztott üvegyöngy segítségével 50 µm külső átmérőnél törtem el a kihúzott üveg kapilláris végét, majd a végét 25 µm átmérőre olvasztottam be. A kapillárist ezt követően a végétől 100 µm távolságban 20°-kal meghajlítottam. A zona pellucida emésztéshez szükséges drilling kapillárist 10 µm átmérőnél törtem el, és 6-7 µm belső átmérőjűre olvasztottam. A teljes kapillárist fecskendővel pH 2.4 kémhatású savas Tyrode oldattal töltöttem fel.

Az embriók preinkubációja

Nyolcsejtes, még nem kompaktalódó, vagy a kompaktalódást csak éppen megkezdő embriókat a sejtek közötti szoros kapcsolatok fellazításának érdekében 20 percen keresztül 37°C-os pH 7,2 kémhatású Ca²⁺ és Mg²⁺ mentes PBS oldatban inkubáltam.

A biopszia lépései

A mikromanipulációt az erre kialakított edényben, egy 3,5 cm átmérőjű, 5-8 db 10 µl M2 médium cseppet tartalmazó műanyag Petri csésze fedelében végeztem, Olympus IMT-2 inverz mikroszkóp fűtött tárgyasztalán, a mikroszkópra szerelt hidraulikus vezérlésű Narishige mikromanipulátorok segítségével. Minden cseppbe egy előinkubált embriót helyeztem el. Az embriót 9 óra pozícióban rögzítettem, a holder kapillárisban létrehozott szívóhatás segítségével. A drilling kapillárist az embrió azon részéhez közelítettem, ahol egy

blasztomer a legnagyobb felületével simul a zona pellucida belső falához. A kapilláris hegyét óvatosan 10 µm kitéréssel vertikálisan mozgattam, egyenletesen vékonyítva a zona pellucidát. A kiömlő sav hatására a peteburkon 25-30 µm átmérőjű, kör alakú nyílás keletkezett. A drilling kapillárist az eltávolítottam a zona sérüléstől, majd a holder kapillárisban megszüntettem a szívóhatást. A holderkapillárisból a médium fújásával és a drilling kapilláris mozgásával az embriót 180°-kal forgattam el. A holder kapillárisban újra gyenge szívóhatást hoztam létre és a drilling kapilláris hegyével a zona pellucidán keletkezett nyílást a holder kapilláris szájához illesztettem. A szívóhatást lecsökkentve a nyíláson keresztül, finoman kontrollálva egy blasztomert a kapilláris üregébe szívtam. A drilling kapillárisvaló enyhe nyomással segítettem a blasztomer kitüremkedését, majd a kapillárist eltávolítottam az embriótól. A tárgyasztalt mozgatva a holderrel tartott embriót a médiumcsepp és az olaj szemben levő határfelületéhez juttattam. A tárgyasztalt továbbmozgatva a holder kapilláris finoman leválasztotta az eltávolítandó blasztomert a médiumban rekedt embrióról. A blasztomert a médiumcseppbe visszahelyezett kapillárisból kifűjtam, majd a tárgyasztal mozgásával a kapillárisokat a következő cseppbe mozgattam, a mikromanipuláció magassági szintjének megváltoztatása nélkül.

In vitro embriótenyésztés

A biopszián átesett, valamint a nem kezelt, kontroll embriókat M2, majd M16 médiumban való átmosás után M16 médiumban tenyésztettem tovább 37°C, 98% relatív páratartalom, és 5% CO₂-mellett. Két napos *in vitro* továbbtenyésztést követően az embriók továbbfejlődési képességét a blasztociszták arányával jellemeztem, valamint Hoechst DNS festéssel megállapítottuk az embriók sejtmag-számát.

Magzatfejlődési vizsgálatok

Az embriók egy részét a biopsziát követő napon álvemhes C57Bl6/CBA F1 recipensekbe ültettük. A vemhesség során a magzatokat három fejlődési szakaszban vizsgáltuk. A vemhesség 9., 13., és 19. napján leölt recipiens nőtények méhéből kiperarálva 8 és fél nap életkorú, korai szomita állapotú, az organogenezis folyamatában levő 12 és fél nap életkorú, és a végső növekedési fázisban levő, közvetlenül megszületés előtt álló, 18 és fél nap életkorú magzatok fejlettségét és életképességét külső morfológiai jegyek alapján bíraltuk el.

Öt recipiens anyát hagytunk megelleni, az alomlétszám nagyságának és az utódok életképességének, és fertilitásának vizsgálata céljából.

AZ ÉRTEKEZÉS FŐBB MEGÁLLAPÍTÁSAI

1. Az *in vitro* embrió-előállítás módszerei

1.1. Petesejtek kinyerésének vizsgálata

Összehasonlítva az üszők és a tehenek petefészkeit megállapítható, hogy bár a tehenek petefészkei jelentősen nagyobbak voltak és a szemmel megfigyelhető tüszőszám is majdnem kétszer több volt a még nem ivarérett üszökénél, a petefészkenként kinyerhető petesejtszám tekintetében ezt az eltérést statisztikailag nem tudtuk igazolni. Habár a tehenek petefészken több tüszőt találtam, az üszök petefészkeiből nagyobb hatékonysággal lehetett petesejteket kinyerni. Az adatok alapján feltételezhető, hogy levágott állatonként 9-10 petesejtet kinyerve 2-3 beültetésre alkalmas embriót lehet rendszerünkben előállítani, s így levágott állatonként egy-két nőivarú embrió létrehozásával számolhatunk. *In vitro* előállított embriókból kialakított embrióbank tervezésekor figyelembe kell venni, hogy számításaink szerint 10 levágott petesejt donortól, mélyhűtést követően az embrió-beültetésekből 4-7 üszőborjú születhet meg.

1.2. Az *in vitro* embriótenyésztés hatékonyságának fokozása új tenyésztőfolyadék alkalmazásával

Két embriótenyésztő médium hatékonyságát hasonlítottam össze az embriótenyésztés 7. napján meghatározott hólyagcsíra arány (hólyagcsírák/ termékenyített petesejtek) alapján. A 10% FCS-sel kiegészített TCM 199 tenyésztőmédium és segítő kumulusz társsejtek használatával 13%, 10 μ l/ml MEM (100x) törzsoldattal, 30 μ l/ml BME (50x) törzsoldattal, 0,5 mg/ml Na-citráttal, 0,1 mg/ml myoinozitollal és 5%FCS-sel kiegészített SOF alapmédium alkalmazásával 23,5% hólyagcsíra arányt tudtam elérni. Mivel a SOFaaci+5% FCS tenyésztőfolyadék majdnem kétszer eredményesebbnek bizonyult, mint a TCM 199+10% FCS, a rutin *in vitro* embrió-előállító programokban is áttértem a SOF használatára. (A rendszer hatékonyságát még tovább növelhető jobb *in vitro* fertilitású termékenyítőanyag alkalmazásával, és a petesejtek érlelés előtti szigorúbb szelekciójával.)

1.3. Az *in vitro* fertilizáció alkalmazása spermaminták funkcionális vizsgálatához

A felúsztatási eljárás szelekciós hatásának igazolása motilitási adatok alapján

Hat tenyészbikától származó spermamintának felúsztatási eljárást megelőző és a felülúszó motilitás-elemzése alapján megállapítható, hogy az eljárás segítségével kialakított felülúszóból származó hímivarsejtek alkotta frakció motilitási jellemzői eltértek a kiindulási minta motilitási jellemzőitől. A nagy motilitású sejtek aránya növekedett (HMOT), valamint nőtt a motilis sejtek aránya (SMOT) is az álló sejtekhez képest. A progresszív előrehaladási sebesség (VEL) is minden bika mintája esetén emelkedett. A egyenes előrehaladással mozgó sejtek aránya nem növekedett jelentősen (STRT). Az eredmények igazolták az eljárás motilitás szempontjából gyakorolt pozitív szelekciós hatását, mivel a felülúszóban csak jobb motilitású hímivarsejtek találhatók a kezelést követően.

A felúsztatási eljárás felhasználása a Kovács-Foote festés egyik értékelési kategóriájába tartozó sejtek csökkent motilitásának igazolására

Kísérletünkben kilenc bika spermamintájának felúsztatás előtti és a kezelést követően a felülúszóban található minta festésével sikerült igazolnunk, hogy az ép akroszómájú, élő, de farki részén festődést mutató sejtek valóban csökkent motilitásúak. A motilitás szempontjából pozitív szelekciós hatást kifejtő felúsztatási eljárással kialakított felülúszóban található sejtek festődése alapján a motilis frakció beazonosítható. A felülúszóban az élő, ép akroszómájú sejtek (ÉÉ) aránya a kezelés hatására statisztikailag igazolhatóan nőtt a kezelés hatására, amíg a festődő farkú frakció (ÉF) mérete szignifikánsan lecsökkent. A megfigyelés alapján bizonyítottam vélem, hogy a Kovács-Foote festéssel az élőként festődő, de immotilis frakció méretének meghatározásával közvetve egy spermaminta motilitását is jellemezhetjük.

*A motilitási adatok alapján a bikák közötti felállított rangsor összevetése az *in vitro* fertilitási adatokkal*

A felúsztatási tesztet követő, motilitási és festési eredmények alapján felállított bikák közötti rangsorok csak részben feleltek meg a termékenyítés során az *in vitro* termékenyítőképességet jelző osztódási % (osztódott embriók/termékenyített petesejtek) alapján felállított rangsoroknak. Megállapítható, hogy önmagában sem a motilitási adatok alapján, sem a Kovács-Foote festés eredménye alapján nem jósolható meg megbízhatóan egy termékenyítőanyag minta *in vitro* termékenyítőképessége.

2. Embrióbiopsziás eljárások kidolgozása, a beavatkozások embrió és magzat fejlődésre gyakorolt hatásának vizsgálata

2.1. Szarvasmarha embriók mikroaspirációs biopsziás módszere

A mindössze fél- másfél percig tartó mikromanipuláció jó minőségű, sejtfragmentumokat nem tartalmazó, ép membránú blasztomerekből álló embriók esetén 90-95%-ban eredményesen végrehajtható. A biopsziát követően mind az embrionális sejtek, mind a kinyert blasztomerek membránja ép marad.

A biopsziát követő in vitro és in vivo továbbfejlődés

A biopsziázott embriók *in vitro* továbbfejlődési képessége nem maradt el a kontroll embriókétól, a továbbtenyésztett embriók közel 38%-a fejlődött tovább hólyagsíra állapotig. Ovum pick up-al üszökből és előhasi üszökből kinyert petsesejtek *in vitro* termékenyítésével előállított nagyértékű embriók biopsziáját is elvégeztem. A mikromanipulációt követő genetikai analízis alapján öt nőivarú blasztocisztát ültettünk be. Az embriótranszfert követően két üszőborjú született meg.

2.2. Egérembriók új mikroaspirációs biopsziás módszere

Kísérleteimben egy új, gyors, hatékony és könnyen kivitelezhető mikromanipulációs eljárást sikerült kifejleszteni, ami csupán két, egyszerűen elkészíthető, mikroköszörülést nem igénylő kapillárisal is elvégezhető. A biopszia során kinyert blasztomerek a genetikai vizsgálat számára ép sejtmembránnal rendelkeznek. A biopsziázott embriókban megmaradó blasztomerek épségét sem veszélyezteti az eljárás. A biopszia az egér embriók mikromanipulációján kívül alkalmas humán terápiás felhasználásra is.

A biopsziát követő in vitro továbbfejlődés

A biopsziázott embriók *in vitro* továbbfejlődési képessége a kontroll embriókéval megegyezett, mindkét csoportban a zona pellucidából azonos arányban bújtak ki a hólyagsírák. A biopsziázott embriók sejtmagszáma azonban lényegesen kevesebb volt a kontroll embriókénál. Ez véleményem szerint csak részben tudható be annak, hogy egy blasztomert eltávolítottunk, csökkentve így az osztódó sejtek számát a harmadik, negyedik osztódási ciklus során. A mikromanipulációs beavatkozás lelassíthatja az osztódás sebességét is, és a rekompaktálódás folyamata is hátráltathatja a folyamatot. A hólyagsírák expanziója

nélkül bekövetkező zona pellucida sérülésen való trofektoderma kitüremkedés is akadályozhatja a sejtek proliferációját.

A biopsziát követő in utero továbbfejlődés

A vemhesség különböző szakaszaiban kipreparált magzatokat megfigyelve a kontrollhoz képest fél-egy napos fejlődési elmaradást csak a vemhesség 9.napján, a korai szomita stádiumban tapasztalatunk. A magzatfejlődés későbbi szakaszában a biopsziázott embriókból származó magzatok a kontroll magzatokhoz képest morfológiai eltérést nem mutattak. A megszületett, biopsziázott embriókból származó utódokon sem fejlődési elváltozásokat, sem szaporodásbiológiai rendellenességeket nem tudtunk kimutatni.

2.3. Az egérmodell tapasztalatainak összevetése a szarvasmarha embriók biopsziát követő, in vitro tenyésztése során megfigyelt jelenségekkel

Feltételezésem szerint a biopsziázott szarvasmarha embriók *in vitro* fejlődése során, a korai blasztociszta stádiumban, az embrió jelentős méretnövekedése és a zona pellucida elvékonyodása nélkül, túl korán bekövetkező trofektodermális sejtkitüremkedés azonos az egér embriókon megfigyelt jelenséggel. Az egérmodellen alapján az embrióbeültetést követően, *in utero* tapasztalt korai magzatfejlődésbeli lemaradás szarvasmarha esetében is jelentkezhet.

AZ ÉRTEKEZÉS ÚJ ÉS ÚJSZERŰ EREDMÉNYEI

1. Az felúsztatási eljárás és az *in vitro* fertilizáció alkalmazása spermaminták funkcionális vizsgálatához

- A Kovács-Foote féle festéssel történő spermaértékelés számára kifejlesztettem egy Internetről ingyenesen letölthető számítógépes programot. A szoftverrel egy személyi számítógép billentyűzetét lehet a festési kategóriák szerinti adatbevitelre alkalmassá tenni, hogy a mikroszkópos számlálás folyamatossága biztosítható legyen.
- A bizonyítottan a motilis, élő sejteket koncentráló felúsztatási eljárás segítségével sikerült közvetve igazolnom, hogy a Kovács-Foote féle festéssel élő, ép akroszómájú, de festődő farkúnak értékelt hímivarsejtek csökkent mozgásképességűek.

2. Embrióbiopsziás eljárások kidolgozása, a beavatkozások embrió és magzat fejlődésre gyakorolt hatásának vizsgálata

- *In vitro* előállított 8-16 sejtes embriók számára sikerült kidolgoznom egy, a gyakorlatban is felhasználható embrióbiopsziás protokollt. A mikroaspirációs biopszián átesett embriók *in vitro* továbbtenyésztése során a túl korán bekövetkező peteburokból való kibújás jelenségét figyeltem meg. A módszer gyakorlati alkalmazása során az embrióbiopsziát követő embriószexálás után beültetett nőivarú embriókból két üszőborjú született meg.
- A mikromanipulációt követően a beavatkozás az *in vitro* embriófejlődésre és a magzati fejlődésre gyakorolt hatásának vizsgálatához egérmodellt alakítottam ki. Sikerült egy új, hatékony, egyszerű embrióbiopsziás módszert kidolgoznom, ami alkalmas a kompaktálódás előtti fejlődési állapotban levő egér embriók egyszerű, gyors mikromanipulációjára.
- Hólyagsíra stádiumban a biopsziázott embriók a konroll embrióknál kevesebb sejttel rendelkeztek. A vemhesség 9. napján a biopsziázott embriók esetén a magzatok fél-egy napos fejlődési elmaradását tapasztaltam, ami a fejlődés későbbi szakaszában már nem volt megfigyelhető. Az elmaradást a beavatkozás hatásának tulajdonítom. Véleményem szerint a jelenséget az embriók rekompaktálódása miatti késés, és a blasztociszta

expanziója nélküli peteburok sérülésen keresztül történő korai trofektodermális kitüremkedés okozhatja.

AZ EREDMÉNYEK GYAKORLATI HASZNOSÍTHATÓSÁGA

- Egy megbízható, az országban egyedülálló *in vitro* embrió-előállító rendszert alakítottam ki, ami alkalmas az alapkutatás, mind a gyakorlat számára beültethető minőségű embriók előállítására.
- Az egyedi petesejt kinyerés és az embriótenyésztés körülményeinek vizsgálata alapján a kialakított embrió előállító technológia génmegőrzési céllal kialakítandó embrióbank számára is felhasználható.
- A felúsztatási eljárás és az *in vitro* fertilizáció alkalmazásával lehetőség nyílik a termékenyítőanyag funkcionális jellemzésére is.
- A spermaértékelési lehetőségek és az *in vitro* embrió-előállítás módszereinek bemutatására létrehozott két Internetes web site oktatási célokra is felhasználható.
- Az *in vitro* előállított szarvasmarha embriók számára kidolgozott mikromanipulációs protokoll MOET nukleusztenyésztési rendszerekben, ovum pick up-pal kinyert petesejtek *in vitro* termékenyítésével létrehozott embriók preimplantációs genetikai diagnózisának elemeként alkalmazható.
- Az általam kidolgozott új mikromanipulációs eljárást az egér embriók biopsziáját lényegesen egyszerűbbé teszi. A módszer felhasználható az embergyógyászatban, az asszisztált reprodukciós terápiában is.

PUBLIKÁCIÓK AZ ÉRTEKEZÉS TÉMAKÖRÉBEN

Angol és magyar nyelvű referált folyóiratokban megjelent publikációk:

1. **BODÓ SZ.**, LACZKÓ L., HORVÁTH G., BARANYAI B., HORVAI SZABÓ M., DOHY J., GÓCZA E. (2002): A simplified biopsy method for precompacted mouse embryos.. Acta Veterinaria Hungarica 50. 469-479. p.
2. **BODÓ SZ.**, BARANYAI B., GÓCZA E., DOHY J., MARKKULA M. (2001): Preimplantation genetic diagnosis in cattle. Acta Veterinaria Hungarica 49. 99-109. p.
3. **BODÓ SZ.**, HIRIPI L., BARANYAI B., POLGÁR ZS., KOBOLÁK J., SOMFAI T., NAGY SZ., KOVÁCS A., DOHY J., GÓCZA E. (2002): Genetic, morphologic, and functional qualification and complex evaluation of bull semen. Scientific Papers of Animal Sciences and Biotechnologies, Timisoara. 35. 532-536. p.
4. **BODÓ SZ.**, GÓCZA E., BARANYAI B., KOBOLÁK J., HORVÁTH G., DOHY J. (2000): A preimplantációs genetikai diagnózis felhasználásának lehetőségei a húsmarha tenyésztésben.. Állattenyésztés és takarmányozás 49. 584-587. p.
5. **BODÓ SZ.**, NAGY SZ., BARANYAI B., SOMFAI T., GÓCZA E., KOVÁCS A. (2000): Spermaminőség jellemzése swim up előtt és után. Állattenyésztés és takarmányozás. 49. 581-583. p.

Konferencia-összefoglalókban megjelent tanulmányok:

6. **BODÓ SZ.**, GÓDOR N., KISS A., SZABÓ M. , NAGY SZ. (2002): Assistance for bull semen analysis – a new information web site and a simple cell counter software.. in Proceeding of 3rd Biannual Meeting of Association for Applied Animal Andrology 40.p.
7. LACZKÓ L., GÓCZA E., KOBOLÁK G., HORVÁTH G., BARANYAI B., **BODÓ SZ.** (2001): Development of mouse embryos in vitro and in vivo following biopsy. ESDAR Newsletter 6, Proceedings of 5th Annual Conference of the European Society for Domestic Animal Reproduction, Vienna 67-68 p.
8. **BODÓ, SZ.**, NAGY SZ., BARANYAI B., GÓCZA E., KOVÁCS A. (2000): Bull sperm quality evaluated with differential staining before and after swim up.. International Conference of Reproductive Biology (incorporating the 9. French-Czech-Slovak Colloquium)

9. **BODÓ, SZ.**, FANCISOVITS, P., ZANDOKI, E., ZANDOKI, R., TOBIAS, S, ZANDOKI, B., BARANYAI B. (1998): Effect of swim-up on the motility and in vitro fertilising ability of frozen-thawed bull semen.. 2nd Conference of the ESDAR in conjunction with the 2nd CECAR Book of abstracts 64. p.
10. **BODÓ SZ.**, HIRIPI L., BARANYAI B., POLGAR ZS., KOBOLÁK J., SOMFAI T., NAGY SZ., KOVÁCS A., DOHY J., GÓCZA E. (2002): Bikasperma genetikai, morfológiai és funkcionális minősítésének és komplex jellemzésének lehetősége. In: Innováció, a tudomány és a gyakorlat egysége az ezredforduló agráriumban konferencia, Állattenyésztési szekció. Debrecen, 2002. április 11-12. Szerk.: JÁVOR A., BÉRI B., DEMK, SZIE, 2002. 103-108. p.
11. BARANYAI B., FANCISOVITS P., ZÁNDOKI E., ZÁNDOKI R., TÓBIÁS S., ZÁNDOKI B., **BODÓ SZ.** (1998): A swim-up módszer hatása felolvasztott bikaspermak motilitására, és ezek in vitro termékenyítési tesztje. XIV.Állat-biotechnológiai Kerekasztal Hódmezővásárhely FLOPPYINFO, 014, ISSN: 1215-4407

Konferencia előadások:

12. **BODÓ SZ.** (2002): A preimplantációs genetikai diagnosztika állatbiotechnológiai alkalmazása. Modellkísérletek. Embriológus Klub, Budapest
13. **BODÓ SZ.**, BARANYAI B., KOBOLÁK J., GÓCZA E (2002): In vitro szarvasmarha embrió-előállítás –alkalmazott embriológiai és andrológiai kísérleti rendszer. Előadás Szaporodásbiológiai Társaság éves ülése, Balatonfüred
14. **BODÓ SZ.**, SZABARI M., SZABÓ L., NÁNÁSSY L., HIRIPI L., KISS A., SZABÓ M., GÓDOR N., NAGY SZ., KOVÁCS A., LACZKÓ L., HORVÁTH G., BARANYAI B., KOBOLÁK J., GÓCZA E. (2002): Új spermaértékelési, embrió-mikromanipulációs és embrió-mélyhűtési módszerek. Előadás. MBK Napok, Gödöllő
15. **BODÓ SZ.**, GÓCZA E., BARANYAI B., KOBOLÁK J., DOHY J. (2001): Az alkalmazott embriológia a szarvasmarhatenyésztés szolgálatában. Előadás. XXVII. Akadémiai beszámoló Genetika szekció, Budapest
16. **BODÓ SZ.**, HIRIPI L.: IVF + PGD (1998): A Preimplantációs Genetikai Diagnózis lehetősége az in vitro szarvasmarha-embrió előállítás során. Előadás. XIV.Állat-biotechnológiai Kerekasztal Hódmezővásárhely
17. **BODÓ, SZ.** (1996): Állat-biotechnológiai konferenciák előadásai az interneten.. Előadás, XII.Állat-biotechnológiai Kerekasztal Sárvár és Bécs

18. **BODÓ, SZ.**, SZABÓ L.: WWW + IVF 1995 MBK Napok, Gödöllő

Internetes website-ok:

19. **BODÓ SZ.**, BARANYAI B. (1996): In vitro production of bovine embryos..
<http://www.abc.hu/institutes/animal/IVF/AFOTORZS.HTML>

20. **BODÓ SZ.**, SZABÓ L, FÁBIÁN P. (1995): IVM-IVF-IVC PROGRAM. Internetes
metodikai leírás. <http://www.abc.hu/institutes/animal/IVF/fotorzs.html>

21. **BODÓ SZ.**, GÓDOR N., KISS A., SZABÓ M. , NAGY SZ. (2002): Assistance for bull
semen analysis – a new information web site and a simple cell counter software.
<http://sperm.abc.hu/>