

DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

BODÓ SZILÁRD

DEBRECEN

2003

DEBRECENI EGYETEM
AGRÁRTUDOMÁNYI CENTRUM
MEZŐGAZDASÁGTUDOMÁNYI KAR

ÁLLATTENYÉSZTÉSI TUDOMÁNYOK DOKTORI ISKOLA

Doktori Iskola vezető: Dr. Bánszki Tamás MTA doktora

Témavezetők:

Dr. Gócza Elen PhD

Dr. Jávor András CSc

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

Készítette:

Bodó Szilárd

doktorjelölt

Debrecen

2003

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

*Értekezés a doktori (PhD) fokozat megszerzése érdekében
az Állattenyésztési tudományok tudományágban*

Írta: Bodó Szilárd doktorjelölt

A doktori szigorlati bizottság:

	Név	Tud. fokozat
Elnök:	Dr. Komlósi István	PhD
Tagok:	Dr. Magyar Károly	CSc
	Dr. Mucsi Imre	CSc

A doktori szigorlat időpontja: 2003. április 22.

Az értekezés bírálói:

Név	Tud. fokozat	Aláírás
Dr. Komlósi István	PhD	
Dr. Bali Papp Ágnes	PhD	
.....		

A bíráló bizottság:

	Név	Tud. fokozat	Aláírás
Elnök:			
Titkár:			
Tagok:			
			
			

Az értekezés védésének időpontja: 200.....

TARTALOMJEGYZÉK

1.	Bevezetés.....	1.
2.	Az <i>in vitro</i> embrió-előállítás és a PGD lehetséges szerepe a MOET, nukleusz tenyésztési eljárásokban - irodalmi áttekintés	8.
3.	A szarvasmarha <i>in vitro</i> embrió-előállítás módszerei és felhasználhatósága.....	23.
3.1.	Az <i>in vitro</i> termékenyítés biológiai alapjai - irodalmi áttekintés.....	23.
3.1.1.	A petesejtek <i>in vitro</i> érlelése.....	24.
3.1.2.	<i>In vitro</i> termékenyítés.....	25.
3.1.2.1.	A termékenyítő anyag előkészítése.....	25.
3.1.2.2.	A megtermékenyülés folyamata.....	26.
3.1.3.	<i>In vitro</i> embriótenyésztés.....	27.
3.2.	A Mezőgazdasági Biotechnológiai Kutatóközpont <i>in vitro</i> szarvasmarha embrió-előállító rendszerének ismertetése.....	30.
3.2.1.	Az <i>in vitro</i> embrió-előállító laboratórium alapfelszereltsége.....	30.
3.2.2.	Petesejt kinyerés – <i>in vitro</i> petesejt érlelés.....	33.
3.2.3.	<i>In vitro</i> termékenyítés.....	34.
3.2.3.1.	A termékenyítőanyag előkészítése.....	34.
3.2.3.2.	A gaméták koinkubációja.....	35.
3.2.4.	<i>In vitro</i> embriótenyésztés.....	35.
3.3.	Az embrió-előállító rendszer hatékonyságának növelésére irányuló kísérletek...	38.
3.3.1.	Petesejt kinyerés optimalizálása.....	38.
3.3.1.1.	Célkitűzés.....	38.
3.3.1.2.	Anyag és módszer.....	38.
3.3.1.3.	Eredmények.....	39.
3.3.1.4.	Következtetések, javaslatok.....	39.
3.3.2.	Két <i>in vitro</i> tenyésztőrendszer hatékonyságának elemzése.....	40.
3.3.2.1.	Célkitűzés.....	40.
3.3.2.2.	Anyag és módszer.....	41.
3.3.2.3.	Eredmények.....	41.
3.3.2.4.	Következtetések, javaslatok.....	42.
3.4.	A termékenyítőanyag funkcionális jellemzésének lehetősége az <i>in vitro</i> fertilizáció módszereinek segítségével.....	42.
3.4.1.	A felúsztatás hatásának elemzése automata motilitás elemző berendezéssel, a motilitási adatok összevetése az <i>in vitro</i> termékenyítés eredményeivel.....	44.
3.4.1.1.	Célkitűzés.....	44.
3.4.1.2.	Anyag és módszer.....	44.
3.4.1.3.	Eredmények.....	46.
3.4.1.4.	Következtetések, javaslatok.....	47.
3.4.2.	A felúsztatás hatásának elemzése Kovács-Foote féle festéssel, a festési eredmények összevetése az <i>in vitro</i> termékenyítés eredményeivel.....	48.
3.4.2.1.	Célkitűzések.....	48.
3.4.2.2.	Anyag és módszer.....	50.
3.4.2.3.	Eredmények.....	51.
3.4.2.3.	Következtetések, javaslatok.....	56.
3.5.	Összefoglalás.....	56.

4.	A preimplantációs genetikai diagnózis alkalmazásának lehetősége a szarvasmarhatenyésztésben.....	58.
4.1.	Irodalmi áttekintés.....	58.
4.1.1.	Bevezetés.....	58.
4.1.2.	A preimplantációs genetikai diagnózis módszerei.....	59.
4.1.2.1.	Embrióbiopszia.....	59.
4.1.2.2.	A blasztomerek genetikai elemzése.....	61.
4.2.	<i>In vitro</i> létrehozott szarvasmarha embriók mikroaspirációs biopsziája - módszertani protokoll.....	66.
4.2.1.	Célkitűzés.....	66.
4.2.2.	Anyag és módszer.....	67.
4.2.2.1.	Mikrokapillárisok készítése.....	67.
4.2.2.2.	Az embriók előállítása <i>in vitro</i> , és a biopsziához való előkészítésük.....	71.
4.2.2.3.	A mikromanipuláció folyamata.....	71.
4.2.3.	Eredmények.....	75.
4.2.3.1.	Biopszán átesett embriók <i>in vitro</i> továbbfejlődési képessége.....	75.
4.2.3.2.	Az embrióbiopszia gyakorlati alkalmazásának eredményei.....	77.
4.2.4.	Következtetések, javaslatok.....	78.
4.2.4.1.	Megjegyzések a mikromanipulációs módszerhez.....	78.
4.2.4.2.	Megjegyzések az embriók <i>in vitro</i> továbbfejlődéséhez.....	79.
4.3.	Egyszerűsített embrióbiopsziás eljárás kidolgozása, a beavatkozás embrió- és magzatkárosító hatásának vizsgálata egérmodellel.....	80.
4.3.1.	Célkitűzés.....	80.
4.3.2.	Az egérembriók biopsziájának irodalmi háttere.....	80.
4.3.3.	Anyag és módszer.....	82.
4.3.3.1.	Az embriók előállítása és <i>in vitro</i> tenyésztése.....	82.
4.3.3.2.	A mikropipetták készítése.....	83.
4.3.3.3.	Az embrióbiopszia menete.....	83.
4.3.3.4.	Az embriók <i>in vitro</i> tenyésztése és recipiensekbe ültetése.....	86.
4.3.3.5.	A magzatok életképességének vizsgálata.....	86.
4.3.4.	Eredmények.....	87.
4.3.4.1.	A biopszia hatékonysága.....	87.
4.3.4.2.	Az embriók <i>in vitro</i> továbbfejlődése.....	87.
4.3.4.3.	Az embriók továbbfejlődése <i>in utero</i>	88.
4.3.4.4.	A megszületett utódok jellemzése.....	88.
4.3.5.	Következtetések, javaslatok.....	89.
4.3.5.1.	Megjegyzések a mikromanipulációs módszerhez.....	89.
4.3.5.2.	Megjegyzések az embriók <i>in vitro</i> továbbfejlődéséhez.....	90.
4.3.5.3.	Megjegyzések az embriók <i>in utero</i> továbbfejlődéséhez.....	91.
4.3.5.4.	A megszülető utódok jellemzése.....	91.
4.4.	Az embrióbiopszia egér és szarvasmarha embriókra gyakorolt, az <i>in vitro</i> fejlődés alatt megfigyelt hatásának összehasonlítása.....	93.
4.5.	Összefoglalás.....	95.
5.	A dolgozat összefoglalása.....	97.
6.	Irodalomjegyzék.....	100.
	Mellékletek.....	115.
	Nyilatkozatok.....	119.

*„Az integráció nem lehet kapituláció, Európa gazdagodása nem járhat nemzetünk szegényedésével.
Az állattenyésztői tudás a nemzet vagyona, elherdálni vétek, megőrizni kötelesség, gazdagítani
megtiszteltetés.”*

In memoriam Dr. Dohy János

1. BEVEZETÉS

Magyarország várhatóan 2004-ben csatlakozik az Európai Unió közösségéhez. A teljes jogú tagság az ország lakossága számára az európai közösség polgárjaival megegyező, gazdasági és kulturális egyenjogúságot biztosít. A közösségen belül a tagsági viszony lehetőséget nyújt a biztosított döntési szabadságjogoknak a nemzeti érdekek szerinti lehető leghatékonyabb kihasználására. Azonban az Unió gazdasági rendszerébe való betagozódásunk jelentős alkalmazkodó készséget is megkövetel hazánktól, mert a nemzetgazdaságnak az európai szabályokhoz is igazodnia kell. Ez számos területen jelentős korlátozást jelent – az Európai Unió tagállamai saját termelésüket és piaci érdekeltységüket védve határozzák meg az újonnan csatlakozók gazdasági mozgási terét. Különösen vonatkozik ez a mezőgazdaság szabályozására. Magyarország lakosságának egyharmada jelenleg is mezőgazdasági tevékenységből tartja fent magát, ezért szociálisan sem elhanyagolható, hogy a magyar mezőgazdaság milyen körülmények között tud működni, eltartva az abból élőket.

Várhatóan a csatlakozást követően a magyar szarvasmarhatenyésztés is igen éles versenyhelyzetbe kerül. A termelési kvótákat és a támogatási lehetőségeket már a csatlakozási tárgyalásokon meghatározták. A tejtermelésre vonatkozó kvóta alig haladja meg a belföldi fogyasztás mértékét. A tejfogyasztás jelenlegi (149,8 l/év), a tíz évvel ezelőtti szintjénél (164,9 l/év) képest jelentősen kisebb, ami a fogyasztói árak növekedésének (feldolgozás költségeinek növekedése, általános forgalmi adóteher, termelési támogatások csökkenése), illetve az életszínvonal romlásának tudható be. A tej és tejtermék fogyasztás mértéke azonban a csatlakozást követően remélhetően emelkedni fog, még ha lassan is - de bizonyosan bekövetkező életszínvonal emelkedés miatt. A termelés nyereségessége megkívánja, hogy az egy tejelő tehénre jutó éves tejtermelés, valamint a tejminőséget

meghatározó beltartalmi értékek szintje növekedjen, miközben az állománylétszám csökken, hiszen a tejtermelési kvóta meghatározza a megtermelhető összes tejmennyiséget.

Az Európai Unióban a közel 86 millió szarvasmarhának 26,7%-a, a 32 milliós tehénállomány kétharmada tejhasznosítású. A legnagyobb méretű állomány Franciaországban (21,5 millió állat), Németországban (15,5 millió állat) és Nagy Britanniában (11,2 millió állat) található (SZŰCS, 2001). A világ egy év alatt termelt tej (532 millió t) 24%-át az Európai Unióban, túlnyomó többségben holstein-fríz, szimentáli, montbeliard, brown, normende, red és jersey fajtákkal állítják elő 954 ezer gazdaságban. Az éves összes tejmennyiség 121 millió tonna, aminek 90%-a kerül saját fogyasztásra, illetve feldolgozásra és 10%-át exportként értékesítik (VAN ARENDONK és LIINAMO, 2003). Az Európai Unió a világ legnagyobb tej és tejtermék exportőre, innen származik a nemzetközi piacra jutó export termékek 45%-a. Az unióban a tej viszonylag alacsony piaci ára, és a belső kvótarendszer arra ösztönzi a termelőket, hogy a tej termelés fajlagos költségeit csökkentsék. A piaci elvárásnak - nagy tejhozam, magas zsír és tejfehérje tartalom - csak a telepenként legalább 70 tehén körüli, vagy azt meghaladó létszámmal rendelkező, középmeretű gazdaságok tudnak megfelelni. (Az átlagos telepméret 1997-ben Nagy Britanniában 69 tehén/telep, Dániában 51 tehén/telep, Hollandiában 44 tehén/telep, Franciaországban 31 tehén/telep volt (VAN ARENDONK és LIINAMO, 2003). Ezekben a gazdaságokban teremthető meg az az ideális termelési környezet, amelyben az alkalmazott tartástechnológia a kedvezőtlen környezeti hatások kiküszöbölésével megengedi a modern tenyésztési eljárásokkal (számítógépes célpárosítási modellek, MOET, nukleusztenyésztés, alkalmazott szaporodásbiológiai technikák) kialakított genotípus optimális realizálását.

Az Európai Unióban 1990 és 2000 között az éves tejtermelés átlagosan 1129 kilogrammal emelkedett, elérve az 5850 kg/tehen-év termelési szintet. A tagállamok között Hollandia vezet a mezőnyt, 7050 kg/év átlagtermeléssel. Németországban a jó minőségű gazdaságok átlagosan 10000 kg/év-es teljesítményre is képesek, jó szemléltetve a genetikai tartalékok kiaknázásának a lehetőségét. Magyarország jelenlegi versenyképességének bizonyítéka, hogy sok magyar gazdaság (pl. Alcsi Rt., Enyingi Agrár Rt.) is képes az európai csúcseredmények elérésére. A termelési színvonal, a tenyésztési eredmények alapján az Unióban várhatóan 2007-re átlagosan eléri a 8000 kg/év körüli szintet. Mivel a belső fogyasztási szükséglet várhatóan nem növekszik, az adott igényt 20-30%-al

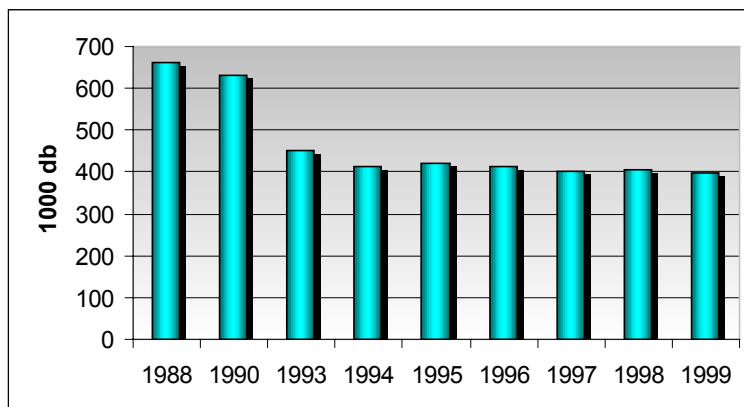
csökkentett tehénlétszámmal is ki lehet majd elégíteni (KALM, 2001). Ez magával vonja a gazdaságok számának a csökkenését is, ami még a fejlett nyugati országokban is szociális feszültséget okoz.

Az intenzív tenyésztési célok elérésében kulcsszerepet játszik a molekuláris biológia, az állatbiotechnológia állattenyésztési alkalmazása. Elsőrendű tenyészcél a generációs intervallum csökkentésével nagyobb genetikai előrehaladást elérni, amihez az embriótechnológia nyújt segítséget. A gyakorlatban a nyolcvanas évektől széleskörűen alkalmazzák a törzstenyészetekben a szuperoovulációt követő embriómosást és embrióátültetést, a MOET eljárást. Ilyen tenyésztési rendszer többek között a Genetique Avenir – Franciaország, 1982; FY-BI - Dánia, 1985; Genus – Nagy Britannia, 1987; Osnabrück ET/DT program, 1987; DELTA, Hollandia, 1989 (GÁSPÁR, 1999). Az elmúlt egy évtizedben elért eredmények is már a biotechnológiai és az alkalmazott szaporodásbiológiai kutatás eredményeinek felhasználásával születtek és a jövőben minél elterjedtebb alkalmazásuk várható.

Magyarországon ezzel szemben az ágazat hanyatlása figyelhető meg – a kilencvenes évek radikális állománycsökkentését nem követte konzekvens megújulás, a tejtermelés 1990 és 1995 között 30%-al, a tejfogyasztás 21%-al, 129,5 l/év-re csökkent. 1996-tól a fogyasztás mértékében gyenge javulás tapasztalható, bár 1998-ban a fogyasztás némileg visszaesett. Annak ellenére, hogy a kereslet mértéke újra emelkedik, mégis kisebb, mint tíz évvel ezelőtt. Az Európai Unióba belépő új tagállamokban hosszabb távon a jövedelmek növekedésével a tendencia megváltozik és a fogyasztói kereslet, a minőségi termékek iránti igény az európai átlagnívó eléréséig növekedni fog (JÁVOR, 1999), amely elvárásnak a hazai termelésnek és termék-előállításnak meg kell felelni.

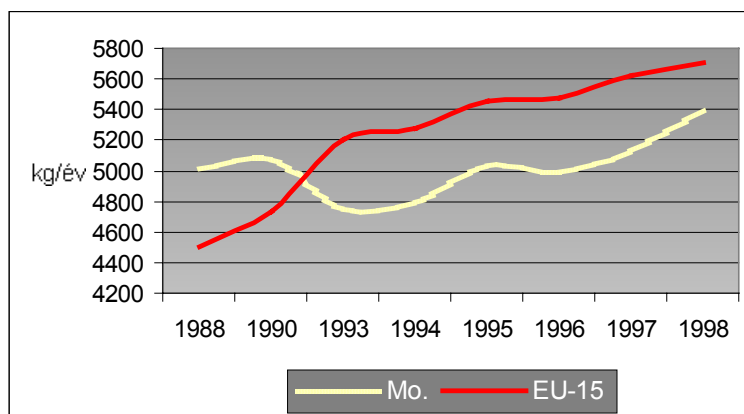
A kínálat oldaláról jelentős piaci versenyhelyzet alakult ki az elmúlt évek során a piac összezsugorodása, a tejipari vállalatok privatizációja, az import lehetőségek megnövekedése, valamint tőkeerős külföldi cégek megjelenése miatt. Ez nem minden esetben kedvezett a hazai szarvasmarhatartóknak, akik sokszor kiszolgáltatott piaci pozícióba kényszerülnek a felvásárlókkal szemben. Ez a termelésbiztonságot és a jövedelembiztonságot bizonytalanná tevő helyzet az egész ágazat fejlődésére korlátozó hatású.

Az állatállomány, alapvetően politikai döntések hatására három éven belül a rendszerváltozás előtti létszám 60%-ára csökkent (1. ábra), és ez a tendencia továbbra is tart.



1. ábra: A hazai szarvasmarha állomány létszámának alakulása

Az európai tendenciával megegyező állatlétszám csökkenés mellett elengedhetetlen lenne azonban a termelési színvonal fenntartása, sőt a hazai piac igényeinek hazai termékkel való ellátása érdekében a termelési mutatók javítása. Az elmúlt évtizedben sikerült a kezdeti (1990-1996) szakasz termelési mutatóinak zuhanását megállítani, a tendenciát megfordítani, az éves átlagos, egy tehénre jutó tejhozam vonatkozásában azonban így is körülbelül 300 kg-mal vagyunk elmaradva az EU-15-ök átlagához képest. Ez azért is rendkívül sajnálatos, mert az eredmények aránya a 80-as évek végén, amikor 11%-al felülmúltuk az EU-15 átlagát, éppen fordított volt (2. ábra).



2. ábra: Az EU-15, és Magyarország éves tejhozama egy tehénre vetítve

A gazdasági társaságok és szövetkezetekben az utóbbi években az átlagos állományméret állandó volt, amit a meglevő termelőkapacitások adottságainak kihasználása tett lehetővé. Az egyéni gazdaságok tulajdonában van az állomány 32%-a. Az egyéni gazdaságok több mint 70%-ában a tehenlétszám 3 db alatt van, a legalább 10 tehenet tartók aránya alacsony, legfeljebb 30 %-ára tehető (FEKETE GYOR, 2001). Az európai tenyésztés elveket figyelembe véve belátható, hogy az egyéni gazdaságok válnak majd leginkább veszélyeztetetté és megnövekszik a termeléssel felhagyó, a versenyt nem bíró gazdák száma. (Természetesen felmerülhet a termelési irány megváltoztatása is. Az Európai Unióban a marhahús termelés visszaesésével, amennyiben Magyarország BSE mentességi státuszával a vásárlók bizalmát vissza lehet nyerni, új lehetőség nyílna a magyar gazdák előtt. Kuriozitásként export szerepet kaphat biohús-termelő fajtaként az extenzív tartású és még a szélsőséges körülményeket is jól toleráló magyar szürkemarka fajta (SZŰCS, 2001).

Hazánkban az általános tenyésztési, állattartási színvonal is megváltozott az elmúlt tíz év során. Bár a szaporulati arány az 1990-ben megállapított 68%-ról 2000-re 78%-ra növekedett (SZŰCS, 2001), az elhullási arány szintje is emelkedett (1990-ben 4%, 2000-ben 5,4% volt) (FEKETE GYOR, 2001). Az EU-ban és húsz éve Magyarországon is jellemző 400 nap körüli átlagos két ellés közötti idő jelenleg 420 napra húzódott szét, ami az éves átlaghozam az optimumtól való 5 százalékos csökkenését eredményezi, emelve a fajlagos termelési költségeket. A tartástechnológiai okokra visszavezethető meddőség és tügygyulladás miatt magas a selejtezési arány, ami korlátozza az állománynövelés lehetőségét. A nem megfelelő tartáskörülmények miatt a teheneket az optimálisnál sokszor jóval korábban küldik vágóhídra - 2002-ben az átlagos laktációs szám 2,4 volt az Állattenyésztési Teljesítményvizsgáló Kft. adatai szerint - így az állományban a termelésbe vont új üszöket, ezért leginkább az állományban jelentkező hiány pótlására használják fel. Ennek figyelembe vételével kijelenthető, hogy az irányított, minőségjavító nemesítő munka és a termelési eredményeken alapuló, nőivarú állományon végzett szelekció számára nem biztosítottak az ideális feltételek. Nehéz helyzetet eredményez a tejtermelés infrastrukturális elmaradottsága – az istálló épületek átlagos kora 31 év. Főleg az egyéni gazdaságokban tapasztalható az épületek korszerűtlen és hiányos felszereltsége, amely az állatok komfortigényét, és az istálló higiéniát alig kielégítő feltételeket teremt, s így szinte lehetetlenné válik az Európai Unió piacon értékesíthető extra minőségű tej előállítása.

Egyértelműen kirajzolódik, hogy a hazai szarvasmarha tenyésztésnek egyszerre több kihívással is szembe kell néznie az EU csatlakozás teremtette versenyhelyzetben. Az egyre nagyobb szerepet kapó, extenzív jellegű, környezetkímélő állattartás mellett a termelési színvonalat mindenképpen javítani kell, a szaporodásbiológiai, tenyésztési, tartási, takarmányozási technológiákat úgy kell az üzemekben megvalósítani, hogy a termelő állomány a környezeti tényezők optimalizálása révén genetikai képességének maximumát nyújthassa, szemben a képességek jelenlegi 70-75%-os kihasználásával (JÁVOR, 1999). Sikeres tenyésztő munka csak megbízható termelési környezetben végezhető el. Ennek alapja a korszerű infrastruktúra és tartástechnológia biztosítása mellett, a tenyésztő szervezetek tenyésztési programjai alapján végzett következetes tenyésztés, és az elengedhetetlen technológiai fegyelem biztosítása. Az ágazatban dolgozók számára biztosítani kell a jövedelembiztonságot, ami csak megfelelő támogatási rendszer tud biztosítani. A támogatási rendszer alapján kell megválasztani a termelési célokat, maximálisan kihasználva a termelés számára megszerezhető forrásokat. Ahhoz azonban, hogy az állattartás a vele szemben támasztott követelményeknek megfelelhessen, nagy genetikai értékkel bíró tenyészállatokkal kell rendelkeznie.

Hogy a hazai állatnemesítés is megőrizhesse a versenyképességét, nem megkerülhető azon modern tenyésztési eljárások alkalmazása és a hagyományos tenyésztési rendszerekbe illesztése, amik az európai piaci versenytársak tenyésztés stratégiájában is fontos, meghatározó szerepet játszanak.

Jelen dolgozat tárgya olyan alkalmazott embriológiai technológiák és a technológiák kidolgozásához szükséges modellkísérleteket eredményeinek ismertetése, amelyek gyakorlati felhasználása hozzájárulhat a hazai szarvasmarhatenyésztés versenyképességének javításához. A kísérletekben kidolgozott eljárások lehetővé teszik embriók hatékony *in vitro* előállítását, és az embriók embriótranszfert megelőző genetikai jellemzését, a preimplantációs genetikai diagnózist (PGD). Ezek a módszerek modern MOET, nukleusz tenyésztési rendszerekbe illeszthetők, amit irodalmi áttekintés segítségével kívánok bemutatni.

Ezt követően saját kísérleti eredményeimet két nagyobb témakör szerint csoportosítva kívánom ismertetni.

A dolgozat első felében a gödöllői Mezőgazdasági Biotechnológiai Kutatóközpontban az általam működtetett, a kutatás, a tenyésztőmunka és az *ex situ* génmegőrzés céljaira egyaránt alkalmazható *in vitro* szarvasmarha embrió-előállító rendszert mutatom be.

- Ismertetem az alkalmazott technológiai fejlesztéseket.
- Az *in vitro* termékenyítési rendszert a felhasznált termékenyítő anyag funkcionális jellemzésére is alkalmaztam.
- A termékenyítés során alkalmazott motilitásszelekciós eljárás segítségével sikeresen igazoltam egy fénymikroszkópos festés (Kovács-Foote festés) eredményének bírálata során az egyik értékelési kategóriájába tartozó, élőként festődő, ép akroszómájú, de festődő farkú hímvarsejtek eddig csupán feltételezett csökkent mozgékonyágát.

A dolgozat második részében embriók embrió-beültetést megelőző PGD-hoz kifejlesztett embrióbiopsziás módszereket ismertetek.

- Bemutatok egy *in vitro* előállított szarvasmarha embriók számára kidolgozott embrióbiopsziás eljárást, amit Finnországban, gyakorlatban is alkalmaztam.
- A szarvasmarha és a humán PGD során használt embrióbiopszia embrió és magzatkárosító hatásának vizsgálata számára egérmódellet hoztam létre. Bemutatok egy új, hatékony embrióbiopsziás eljárást, amit egérembriók biopsziája számára dolgoztam ki, és ami a humán terápiás gyakorlatban is felhasználható.
- Ismertetem a szarvasmarha és egérembriókon a biopsziát követő *in vitro* továbbtenyésztés során megfigyelhető hasonló elváltozásokat.

A bemutatott kísérleteket önállóan terveztem meg és munkatársaim segítségével a gödöllői Mezőgazdasági Biotechnológiai Kutatóközpont Embriológiai Laboratóriumában (vezető: dr. Gócza Elen), valamint a jokioineni Agricultural Research Centre Embriológiai Laboratóriumában (vezető: dr. Merja Markkula) végeztem 1998 és 2002 között.

2. AZ *IN VITRO* EMBRIÓ-ELŐÁLLÍTÁS ÉS A PGD LEHETSÉGES SZEREPE A MOET, NUKLEUSZ TENYÉSZTÉSI ELJÁRÁSOKBAN

IRODALMI ÁTTEKINTÉS

A hazai tenyésztésű szarvasmarha állomány genetikai értékét, mind a tejelő, mind a kettős és húshasznosítású fajták esetén, alkalmazkodva a nemzetközi fejlődés üteméhez, csak az ágazatban végbemenő, vertikális integrációt feltételező és igénylő, tudatos, körültekintő tervezéssel meghatározott, a tenyészcélokat következetesen figyelembe vevő nemesítő munka révén lehet megnövelni, hogy az ágazat európai szintű versenyképessége fenntartható legyen. A vertikális integrációban a nemesítő, árutermelő, feldolgozó és kereskedelmi egységek együttműködését, a tenyésztés távlati céljának elérését a befektető tőkeerős integrátor szervezi és irányítja (DOHY, 1999). Magyarországon ezt a hosszabb távú beruházásokat megkívánó integrátori szerepet egyelőre nem vállalják a termékértékesítő, feldolgozó, javarészt külföldi tulajdonban levő tej és húsipari vállaltok. A hazai fajtáink tenyésztéséért felelős, a tenyésztési programokat kialakító tenyésztőszervezetek, egyesületek a forrás hiány miatt, külön állami támogatás nélkül a vertikális integrációt csak részben tudják elvégezni, biztosítva a rendkívül fontos tenyészértékbecslési, szelekciós és nyilvántartási háttérrel. A modern, jó tartási körülményeket megkövetelő alkalmazott szaporodásbiológiát, állatbiotechnológiát is felhasználó tenyésztési eljárásokat csak részben – az embrió-átültetés előnyeit kiaknázva alkalmazzák (pl. Bos-Genetic Kft. Együttműködve az Osnabrücki Tenyésztőszövetséggel, DOHY, 1999). Az intenzív fejlesztést megkövetelő versenyhelyzet miatt ezek az eljárások egyre nagyobb szerephez jutnak, és a tenyésztési eljárásokba való beillesztésük nem maradhat el.

Az intenzív nemesítő munkát az erre a célra létrehozott törzstenyészetekben – nukleuszpopulációkban lehet elvégezni. A törzstenyészetek és az árutermelő gazdaságok kapcsolata alapján több nukleusz típus különböztethető meg. A legegyszerűbb formában a nukleusz tenyészbika előállító tenyészet, amiben a termelési cél az árutermelő állományok ellátása bikanevelő tehenektől származó javító hatású apaállatokkal, illetve termékenyítőanyaggal. Szaporítóanyag előállító vállalatok is létrehozhatnak integrátorként nukleusztenyészetet, ilyenkor az integráció három tagból áll. Egy másik változatban, a

törzstenyészet mindkét ivarú tenyészállat előállításra vállalkozhat a szaporító üzem számára, ami elvégzi az állatok minősítését, tenyészértékbecslését. A saját teljesítményvizsgálat alapján nagy tenyészértékűnek bizonyuló tehenek visszajuttatása megújítja a nukleuszpopulációt, valamint az árutermelést ellátja szaporítóanyaggal (DOHY, 1999).

A nukleusz populációban végzett tenyésztés alapja a mesterséges termékenyítésen, a nőivarú donor állatok szuperovulációján, és embriómosásán alapuló MOET eljárás.

A már a második világháborút megelőzően világszerte elterjedt mesterséges termékenyítés a hatvanas évektől - a spermamélyhűtés és tárolás technológiájának kidolgozásával a szarvasmarha-tenyésztés és nemesítés alapvető eljárása lett. A bikák között, az utódok teljesítménye alapján rendkívül hatékonyan lehet szelekciót végezni, hiszen ha csak a kiválónak minősülő bikákkal történik termékenyítés, nagy mértékű genetikai és ökonómiai haszonra lehet szert tenni. Egy csúcsbikával évente akár 40000 termékenyítésre elegendő termékenyítőadagot is elő lehet állítani. A nagy tenyészértékű állatok így széleskörűen, a nemzetközi szaporítóanyag kereskedelem révén nemzetközileg is képesek kiváló tulajdonságaikat továbbörökíteni.

A nőivar részéről hasonló egyedi preferenciára a szarvasmarha unipara volta miatt nem volt lehetőség, hiszen egy jól tejelő állatnak élete során legjobb esetben is legfeljebb tíz utóda születhetett, pedig petefészkeiben 150000 potenciálisan termékenyíthető petesejttel rendelkeznek. A szaporodásbiológusok ennek a petesejt-kapacitásnak a kiaknázása céljából dolgozták ki az embrió-átültetés technológiáját. Habár már 1950-ben megvalósították az első sikeres szarvasmarha embrió-átültetést (WILLETT és mtsai, 1951), csak több mint húsz év múlva terjedt el a módszer általánosan és vált kulcsfontosságúvá az intenzív genetikai előrehaladást célul kitűző tenyésztési rendszerekben.

Ennek az volt a feltétele, hogy laboratóriumi, majd üzemi kísérleti környezetben kidolgozzák a

- gonadotrop hormonok alkalmazása segítségével az egyszerre ovulálódó petesejtek számát meg többszöröző szuperovulációs kezelést,
- az embrióknak a női nemi traktusból való, az állatot legkevésbé igénybevevő, egyszerű, vértelen kimosási módszert (GORDON, 1994),

- a beültetendő embriók fejlettségét figyelembe vevő recipiens állatok szinkronizálását (HASLER és mtsai, 1987),
- valamint a recipiensek zárt méhnyak csatornáján keresztül történő, de az inszeminálás műveletéhez hasonló, Cassou pisztolyt használó vértelen embrióbeültetést (GORDON, 1994). (A szükséges technológiai lépések az inszeminátori tapasztalattal rendelkező szakemberek számára így aránylag könnyen elsajátíthatóvá váltak.)

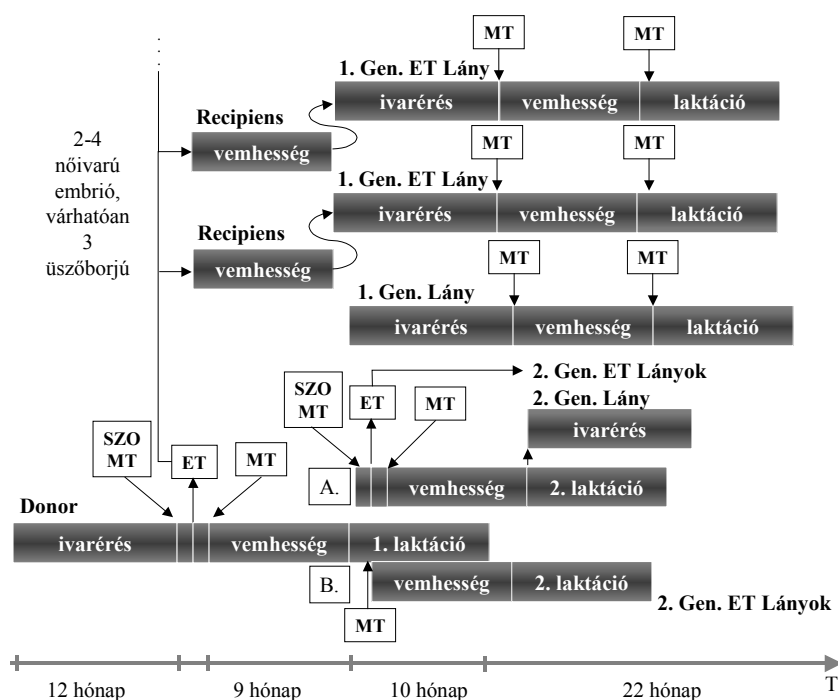
Az embrió-átültetés jelentősége az egy tenyészbika létrehozásához szükséges bikanevelő tehenek számának csökkenésével szemléltethető. Míg a korábbi, csak mesterséges termékenyítést alkalmazó tenyésztés során átlagosan hat, az embrió-átültetés alkalmazásával egy bikához egy bikanevelő tehen is elegendő (LOHUIS, 1997). A bikanevelő tehenállományban 1987-ben Kanadában 58%-ban, az USA-ban és Franciaországban 50%-ban, 1995-ben már több mint 85%-ban a tenyészbikák embrió-átültetésből származnak (LOHUIS, 1997) – amit a bika elnevezésében ET kitétellel meg is jelölnek.

ROBERTSON és RENDEL 1950-ben megfogalmazott törvénye képezi a MOET elméleti alapját: a genetikai előrehaladás a szelekciós differenciál, az örökölhetőség és a megbízhatóság szorzatának a generáció intervallummal való hányadosa (DOHY, 1999).

A két szaporodásbiológia beavatkozást magában foglaló zárt törzstenyésztetben realizálható jelentős genetikai előrehaladást a szelekciós intenzitás növelésével és generációs intervallum csökkentése révén lehetővé tevő nukleusz MOET rendszert NICHOLAS és SMITH ismertette 1983-ban.

A termelés számára tenyészbikák előállításához kidolgozott un. juvenilis MOET rendszerben a csúcsbikák lányait egy éves korban szuperovuláltatják, termékenyítik és a kimosott, átlagosan 4-7 embriót recipiens állatokba ültetik. Az embriómosást követően, a donor állatokat 15 hónapos korban ismét termékenyítik, majd az ellést követően minősítik első laktációs tejtermelésük alapján (3. ábra). Az ábrán a donor első ellését követően két alternatív lehetőséget tüntettem fel - A.: A donort újra szuperovuláltatják; B.: A donort az első laktáció alatt hagyományosan termékenyítik. Az első beavatkozást követően alig 21

hónappal mind a saját maga által kihordott lányát (amire 50% esély van), mind, az átlagosan 70%-ban sikeres embrió-átültetésből származó 2-3 nőivarú utódot termékenyítik. Mire, a két éves és nyolc hónapos donor második laktációja lezárul, az első generációs lányok laktációs termelése is befejeződik (CHRISTIENSEN, 1997). A nőivar generációs intervallumát csökkenti, és ebből következően a genetikai előrehaladást növeli az üszők szuperoovulációjával és az első generációs lányutódok első generációs tejtermelésének értékelésével végzett donorszelekció (COLLEAU, 1985).

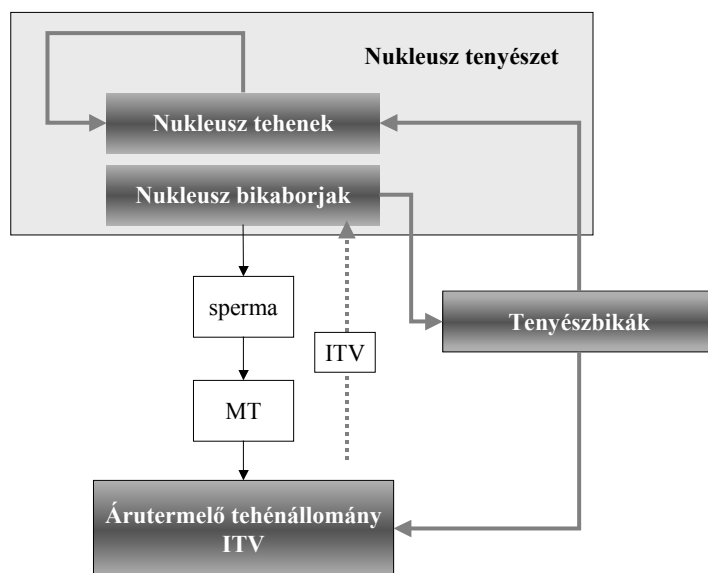


3. ábra: Egy feltételezeten nagy tenyészértékű üsző MOET alkalmazása. SZO: szuperoovuláció, MT: mesterséges termékenyítés ET: embriótranszfer

A törzstenyészetben így egy generáció lefolyása alatt több adatot kapunk az embriódonor tenyészértékről, kedvező tulajdonságainak átörökítő képességéről, mint a hagyományos tenyésztés során az egész életteljesítmény alatt. Ez lehetőséget ad a nőivarú szelekcióra. Amennyiben a donor, utódainak laktációs teljesítménye alapján kiváló tenyészértékűnek

minősül, azt a továbbiakban szaporítóanyag előállításra – embriótermelésre használják fel. Ezzel egy új hasznosítási irány jelenik meg, a bizonyítottan csúcstulajdonságokkal rendelkező állatokat genotípusuk minél nagyobb körben való elterjesztésére, embriótermelésre használják fel.

A nukleusztenyésztési rendszerek lehetnek centralizáltak, amikor egy telepen belül tartják a törzsállományt, valamint diszperz nukleusz tenyészetek, amikor az állományt több telepen, több gazdaságban tartják, akár internacionális együttműködésekben is. Ilyen többek között a több országban összehangoltan működő *Nordic Cattle Genetic Evaluation* (NCGE) konzorciumhoz kapcsolódó ASMO nukleusztenyésztési rendszer (JUGA, 2002). A hibrid nukleusz tenyésztési stratégia szerint a nukleusz bikák ivadék teljesítmény vizsgálatát a hagyományos tenyésztésben levő üsző és tehénállomány felhasználásával végzik el (COLLEAU, 1985) (4. ábra).

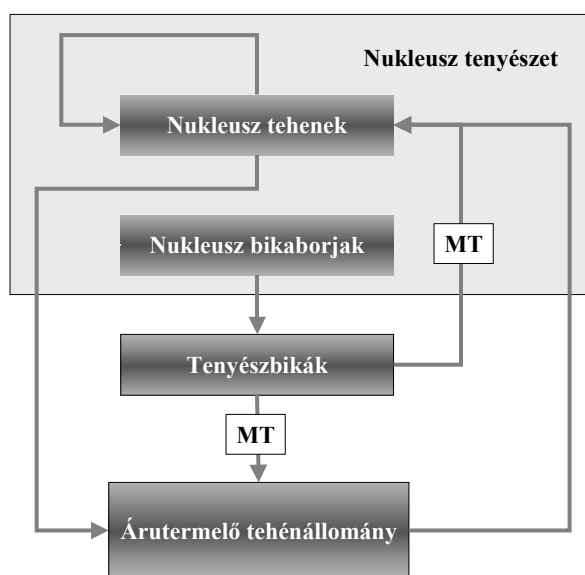


4. ábra: Hibrid MOET-ITV tenyésztési rendszer (DÜRR, 1997 nyomán)

A centralizált rendszer előnye a torzításmentes megbízható teljesítményvizsgálaton alapuló standardizált tenyésztérték bírálat, valamint a megbízhatóságot növelő azonos üzemi környezet. Centralizált tenyésztési rendszerek a GENUS (Nagy Britannia), a DELTA

(Hollandia) és az FY-BI (Dánia). A zárt tenyészetekben az állomány kis mérete, a nagy szelekciós nyomás, a testvér-testvér, szülő-gyerek párosítások miatt a kívánatos genotípus kialakítása azonban a genetikai variancia csökkenésével, a rokontenyésztettség növekedésével jár együtt (DOHY, 1999), mértéke a hagyományos tenyésztéshez képest közel tízszeresére emelkedik (2% vs. 0,2-0,5%) (LOHUIS, 1998).

A teljesen zárt, általában centralizált, a szaporítóanyagot kizárólag a törzstenyészetben belül előállító rendszer mellett lehetőség van nyitott nukleusz tenyésztési rendszer alkalmazására is (CHRISTENSEN és LIBORIUSSEN, 1986). (5. ábra)



5. ábra: Nyitott nukleusztenyésztési rendszer vázlata (DÜRR, 1997 nyomán)

Nyílt és diszperz MOET szisztémában működik az ET-DT Osnabrück (Németország), az ASMO (Finnország) és az Embryo-Import (Franciaország) (LOHUIS, 1998).

A nyílt rendszer előnye, hogy rugalmas kölcsönhatásban áll az árutermlő környezettel, ellátva azt szaporítóanyaggal. A recipiens állatokat a termelő gazdaságokban tartják, és a nukleusz szelekciós limitjét el nem érő egyedeket az árutermlés számára értékesíthetik. A csúcsegedeket előállító nukleuszt genetikailag folyamatosan frissítik az aktuálisan legjobb, nukleuszon kívüli bikák szaporítóanyagával, valamint az árutermlő

gazdaságokban nagy tenyésztékűnek bizonyuló tehenek bevonásával. A nyitott nukleusz tenyészetekben, a tartásból és a bevonandó külső szaporító anyag miatt felmerülő költségeket, a kereskedelmi tevékenység ellensúlyozza. A mesterséges termékenyítő vállalatok, a nukleuszokban végzett genetikai program segítségével, akár 20-60%-al nagyobb profitra tehetnek szert, mint a hagyományos tenyésztési eljárások alkalmazása esetén (DEKKERS és SHOOK, 1990).

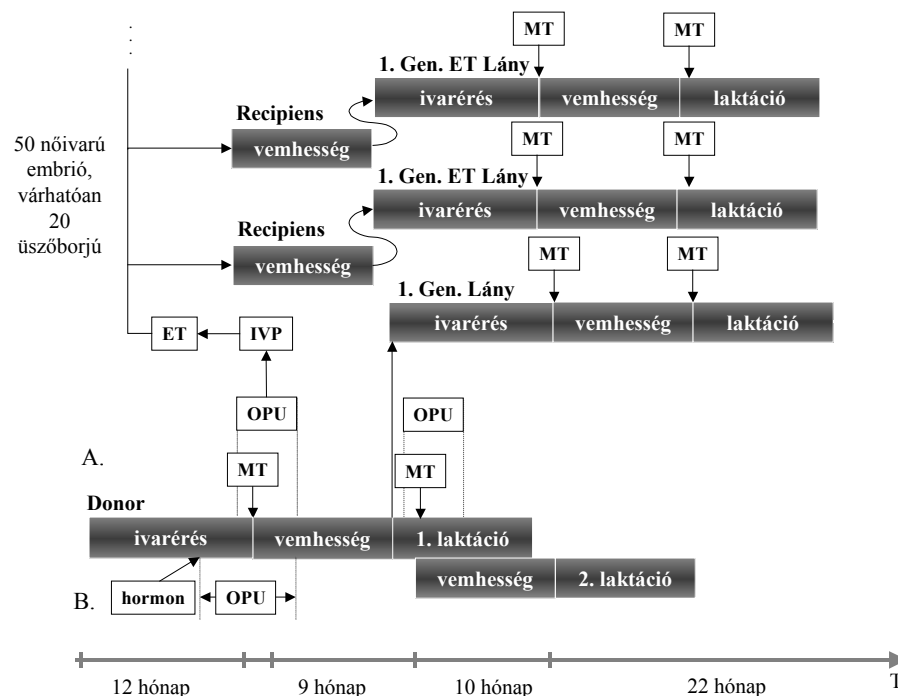
Az említett tenyésztési rendszerek a minél nagyobb genetikai előrehaladás elérése céljából az elmúlt 15 év biotechnológiai fejlesztéseit is felhasználják. A tenyésztési rendszerbe illesztve a transzvaginális ultrahanggal való petesejt kinyerést (ovum pick up, OPU) (TANEJA és YANG, 1998; GALLI és mtsai, 2001) és az *in vitro* embrió-előállítás módszerét (GORDON, 1994), a generációs intervallumot tovább lehet csökkenteni. A költségek mérséklése érdekében az embriószexálást (BODÓ és mtsai, 2001), valamint a szelekciós intenzitás növeléséhez a molekuláris biológia kínalta segítséget, a géntérképezést és a marker segítette szelekciót alkalmazzák (FÉSÜS, 1997; ÁRNYASI, 2001).

Akár csak az embrió-átültetési technológia tenyésztési alkalmazása esetében, az újabb szaporodásbiológiai és biotechnológiai eljárásoknak a technológiához illesztését is megelőzte - megelőzi egy alkalmazott kutatási szakasz. A kilencvenes években sikerült kidolgozni egy aránylag hatékony *in vitro* embrió-előállítási technológiát – bár a fejlesztési szakasz még koránt sem zárult le. Példaként említhető a valószínűsíthetően a korai embriófejlődés epigenetikus zavaraira visszavezethető, nehézellést okozó ún. „Large calf syndrome”, amit a nem teljesen kielégítő embriótenyésztési környezet okoz. A kutatók a korai embriófejlődés génműködésének alap kutatás jelegű vizsgálatával segíthetik az alkalmazott kutatókat az *in vitro* rendszer tökéletesítésében. A kilencvenes évek közepétől alkalmazzák a MOET rendszerekben a transzvaginális ultrahang segítette petesejt kinyerést, ami az *in vitro* embrió-előállítási rendszerhez illesztve állít elő beültethető hólyagcsírákat. Egy állattól, heti kétszeri petesejtnyeréssel, akár 15-20 petesejt is nyerhető hetente. Így évente 700-1000 petesejt *in vitro* termékenyítésével kb. 200-300 blasztocisztát lehet előállítani. A hólyagcsírák beültetésével 80-120 vemhesség érhető el (TANEJA és YANG, 1998).

A módszer előnye, hogy

- nem szükséges a donorok szuperovuláltatása, az csupán a még nem ivarérett üszők esetében javasolt (PRESICCE és mtsai, 1993);
- az OPU-t hetente kétszer a vemhesség első harmadáig a magzat veszélyeztetése nélkül végre lehet hajtani (MEINTJENS és mtsai., 1993);
- a petefészek egészségi állapotát nem érintő meddőségi problémákban szenvedő tenyészállatoktól is lehetővé válik a petesejtnyerés (HASLER és mtsai. 1995);
- a petesejtek *in vitro*, csoportos termékenyítésével, a termékenyítőanyaggal is takarékoskodni lehet (GORDON, 1994).

A módszer hatékonyságát leginkább az *in vitro* embrió előállítás korlátozza. Az embrió-előállítás aránylag kis hatékonyságú, és az embriók életképessége gyengébb a mosott embriókéhoz hasonlítva. Az embrió-átültetés ezért csak 40%-os hatékonyságú (YANG és mtsai, 1998). Az embriótenyésztési eljárás tökéletesítésével az *in vivo* petesejtkinyerés valószínűsíthetően a juvenilis MOET rendszerek alapvető eljárása lesz (6. ábra).

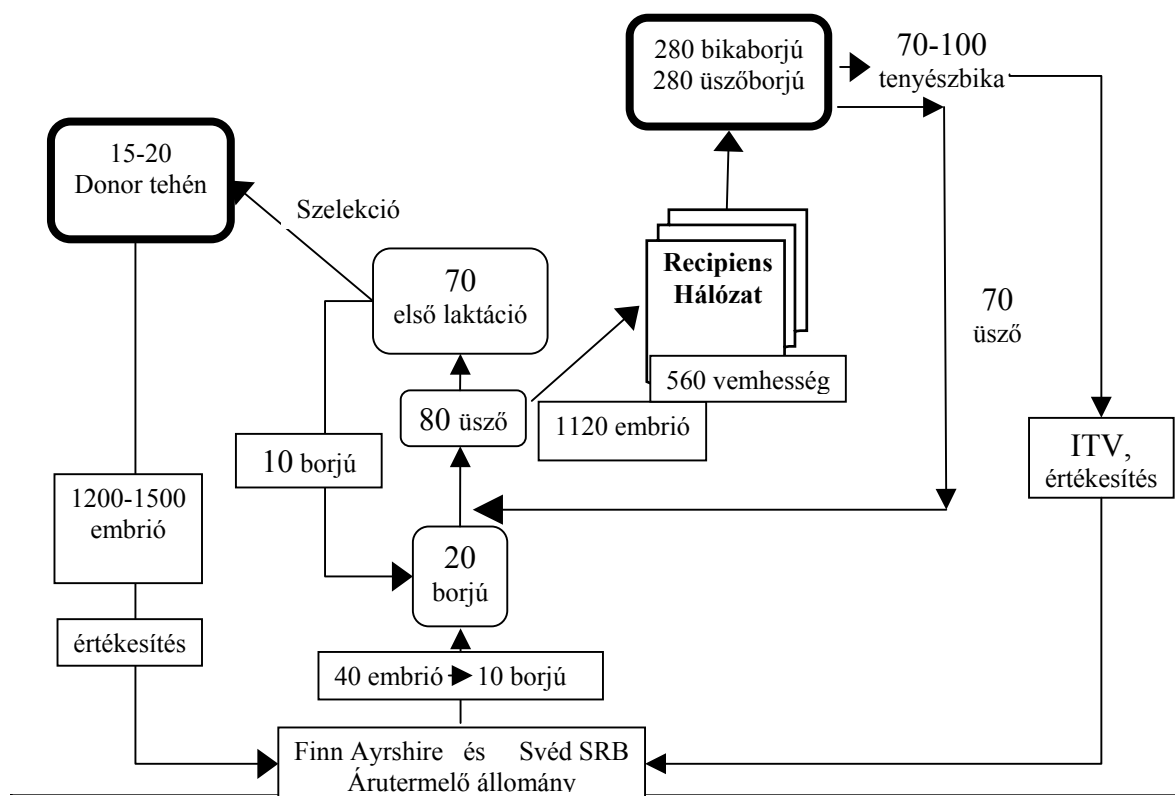


6. ábra: OPU+IVP alkalmazása. A: 11 hónapos korban elkezdett program B: prepubertás korban indított program

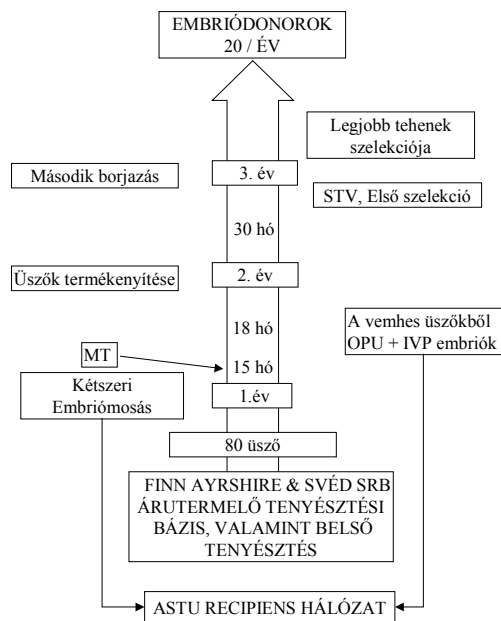
A 3. és a 6. ábrát összehasonlítva látható, hogy az OPU-t felhasználó programokban, mire a bikanevelő jelölt üsző befejezi a második laktációját, akár húsz leánya is megszülethet. Az eljárás segítségével a bizonyítottan jól termelő tehenek petesejt donorokká válhatnak. A prepubertás korban végzett petesejt kinyeréssel a generációs intervallumot még jobban szűkíteni lehet.

A PGD fontos szerepet játszhat akár a csak embrió-átültetést, vagy az OPU és *in vitro* embrió-előállítást felhasználó, de az ezek kombinációját alkalmazó rendszerekben is. Az embriószexálás révén felére csökkenthető a szükséges recipiens állatok száma, ami lényeges költségmegtakarítást eredményez (a vemhes recipiens állat tartási költségére kb. 400 Euró számítható).

A szexálást és *in vitro* embrió-előállítást felhasználják az ASMO nukleusztenyésztési rendszerben is (7., 8. ábra).

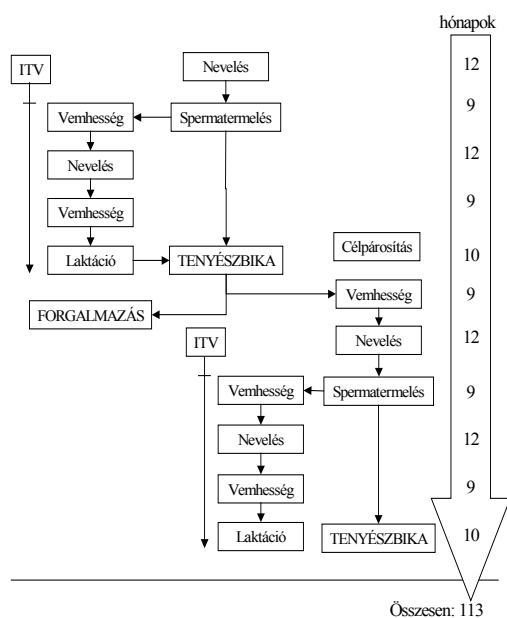


7. ábra: Az ASMO nyitott nukleusz szerkezete

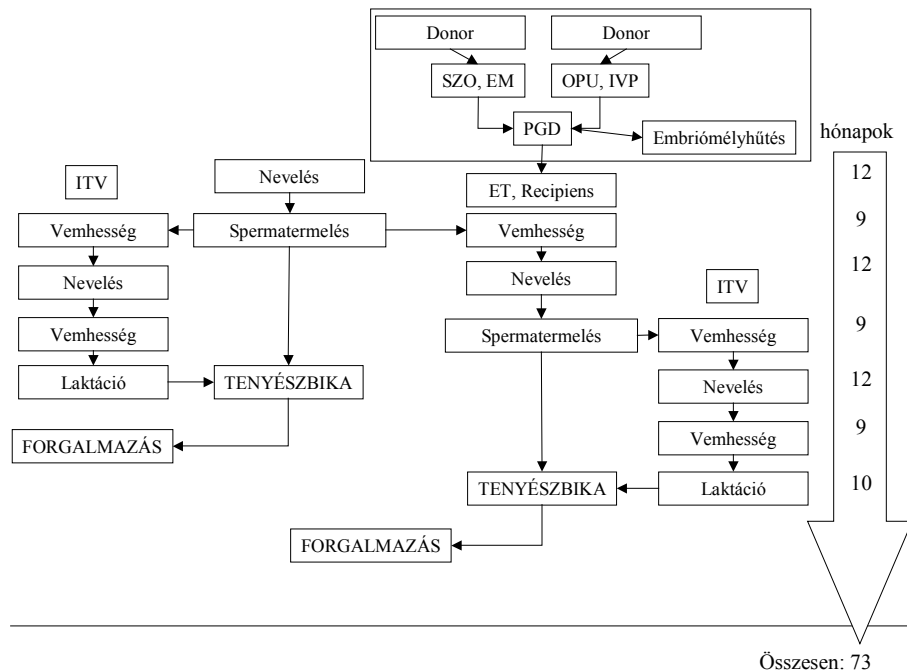


8. ábra: Embriódonor előállítás az ASMO nyitott nukleuszban

A nukleusztenyésztésben a hagyományos bikaelőállítás időbeli hosszát (9. ábra) akár 3 és fél évvel is le lehet csökkenteni, amennyiben a tenyészbikajelöltek termékenyítőanyagával, a termékenyítőanyag termelés kezdetén az ITV mellett, rögtön bikanevelő teheneket, illetve bikanevelőnek kijelölt üszőket is termékenyítünk (10. ábra).



9. ábra: Hagyományos bikaelőállítás.



10. ábra: Csökkentett idejű tenyészbika előállítás. SZO: szuperovuláció, EM: embriómosás, OPU: ovum pick up, IVP: in vitro embrióelőállítás, PDG: preimplantációs genetikai diagnózis, ET: embrióátültetés

A célpárosítás során alkalmazhatjuk a nőivarú állatok

- szuperovuláltatását, és embriómosását, majd az embriók ivarának meghatározása után a hím ivarú embriók recipiens állatba ültetését,
- ovum pick up és in vitro embrió-előállítást követően is elvégezhető a preimplantációs genetikai diagnózis, amit az embrió-beültetés követ.

Az embriók mélyhűthetők, és amint a tenyészbika jelölről bebizonyosodik, hogy javító hatású, az embriók a termékenyítőanyag forgalmazással egyidőben kereskedelmi forgalomba, vagy a nukleusz tenyészet genetikai bázisába kerülnek.

A fejlett országok állattenyésztése számára a fenti példák alapján a kutatólaboratóriumokban kapott kísérleti eredmények felhasználásával új tenyésztési eljárásokat, technológiákat alakítanak ki, amelyeket az alkalmazott kutatás segítségével folyamatosan továbbfejlesztnek. Ez csak jelentős tőkekoncentrációval vihető végbe, amihez nemzetközi, állami, és magán tőkét is felhasználnak.

Az elmúlt 15-20 év alatt az állatbiotechnológiai kutatás az alkalmazott szaporodásbiológiai, embriológiai és biotechnológiai módszerekből egy komplex, embriótechnológiai hálózatot hozott létre, ami a beavatkozások jellegénél fogva a 11. ábráról leolvasható három nagy kategóriára osztható fel.

Hiba! Érvénytelen csatolás.

11. ábra: Az embriótechnológia komplex rendszere

Az ábrán az A. területen, a legelőször az állattenyésztés szolgálatába illesztett eljárás, a szuperovuláltatással történő petesejt-sokszorozást követő embriómosás, az embriómélyhűtés és az embrió-átültetés alkotta alkalmazott szaporodásbiológiai eljárás, a MOET látható. A technológia gyakorlatilag a nyolcvanas évek végére vált teljesen kiforrottá. Ezen a kutatási bázison kezdődhetett el a bonyolultabb eljárások – B. terület - fejlesztése a nyolcvanas-kilencvenes években. Az élő, vagy halott donor állatokból származó petesejtekből, *in vitro* érlelésüket követő *in vitro* termékenyítésük után embriók tenyészthetők a természetes *in vivo* körülményeket szimuláló *in vitro* embrió-előállító rendszerekben. A létrehozott embriókat a MOET eljárásokban megszokott módon ültetik a recipiens állatokba. Mindkét embriótechnológiai terület összekapcsolható az embriók beültetés előtti genetikai vizsgálatával, a PGD-vel. Az *in vitro* embrió-előállítást, és a PGD-t részben már alkalmazzák a gyakorlatban, mellette azonban intenzíven dolgoznak a technológia hatékonyságának fokozásán is. A kilencvenes években kezdődött meg a genom megváltoztatására irányuló invazív biotechnológiai beavatkozások (klónozás, a transzgenezis és az összejttenyészetek létrehozása) fejlesztése (C. technológiai terület). Az alapkutatási szinten álló módszerek az *in vitro* embrió-előállítási technológia vázához szorosan kapcsolódnak. A korszerű *in vitro* rendszer rutinszerű működtetése elengedhetetlen feltétele az alapkutatásnak. A technológiai láncolatot elemezve látható, hogy megbízható embrióátültető háttér nélkül azonban az *in vitro* embrió-előállítás kizárólag csak az alapkutatást tudja támogatni.

A kilencvenes években Nyugat Európában, az Egyesült Államokban, Ausztráliában és Új Zélandon gazdasági racionalitásból államilag támogatott állat-biotechnológiai kutatások a gyakorlat számára felhasználható technológiákat eredményeztek. A kilencvenes évek

végére, alig 5-7 évnyi fejlesztést követően, pl. a OPU és a petesejtek *in vitro* termékenyítésével való embrió-előállítás a modern nukleusz tenyésztési rendszerek (pl. Holland Genetics CR DELTA, Hollandia; ASMO nukleusz tenyésztési rendszer, Finnország; TREND nukleusz tenyésztési rendszer; Kanada) alapvető alkalmazott szaporodásbiológiai eljárássá vált. Sybrand Melton, a Holland Genetics embrió-átültetési és *in vitro* embrió-előállító részlegének vezetőjének 1999-es személyes közlése szerint kizárólag a nukleusz tenyésztés számára évente 1500 *in vitro* előállított, és 3500 szuperovulációt követő embriómosás révén kinyert embriót ültetnek a recipiens állatokba. A nemzetközi piacon a termékenyítőanyag forgalmazók mellett vagy ezen vállalatok részlegeként, megjelentek az embriókereskedelemmel foglalkozó cégek, amelyek a katalógusaikban szereplő *in vitro*, vagy mosott, esetleg genetikailag jellemzett – szexált embriókat az Interneten kínálják a vásárlóknak. Az embrió-előállítás egy új mezőgazdasági tevékenységgé vált, ahol a termelési cél magának a szaporító anyagnak kereskedelmi célú előállítása. Az 1. táblázat ilyen vállalatok Internetes elérhetőségét tartalmazza. Az Internet lehetőséget teremt az *on line* üzletkötésre is, a virtuálisan felkínált embriókat a banki transzfer igazolását követően légi úton azonnal el is juttatják a megrendelőhöz.

<i>Cég</i>	<i>Internet cím</i>
➤ AB Technology, USA	http://www.abtechnology.com
➤ ABS Global, USA	http://www.absglobal.com/home.html
➤ Acorn Embryo, USA	http://www.acornemb.com/
➤ CYAGRA, USA	http://www.cyagra.com/index.html
➤ EmTran, USA	http://www.emtran.com/
➤ NorthStar-Select Sires, USA	http://www.northstarcooperative.com/A_I/index.htm
➤ Trans Ova Genetics, USA	http://www.transova.com/
➤ Marple Hill Embryos Inc., Kanada	http://www.execulink.com/~hill/
➤ Embryobec, St- Veterinary Clinic, Kanada	http://www.embryobec.com/frameang.html
➤ Embryogenex, Creekside Animal Clinic Ltd, Kanada	http://www.creeksideanimalclinic.com/frame1.html
➤ Laboratory of Technologies of Reproduction, Olaszország	http://www.ciz.it/ltr/Ltr_index1_e.htm
➤ EMBRYO PLUS, Dél Afrika	http://www.embryoplus.com/
➤ Jeffco International Ltd, Új Zéland	http://www.jeffco.co.nz/embryo.htm
➤ Total Livestock Genetics, Ausztrália	http://www.tlg.com.au/

1. táblázat: Internetes kereskedelemben résztvevő „on line” embrióforgalmazó cégek

Magyarországon is felmerült az igény intenzív genetikai előrehaladást produkáló, állatbiotechnológiát is magába integráló modern nukleusztenyésztési rendszerek kialakítására. Hazánkban a nyolcvanas évektől folynak embrió-átültetések szarvasmarhán. A rövid kísérleti szakaszt hamarosan felváltotta a gyakorlati alkalmazás, köszönhetően dr. Sárkány Pál, dr. Soós Pál, dr. Szász Ferenc, dr. Pécsi Tamás, dr. Solti László, dr. Seregi János, dr. Cseh Sándor, dr. Flink Ferenc, a módszer elterjesztésében vállalt kitartó munkájának. Ennek ellenére, másfél évtized múlva, az országban jelenleg alig több mint két tucat, az OMMI által regisztrált embrióátültető szakember (pl. Zubor Tibor) tevékenykedik. (Az importtal szemben az export embrióértékesítésünk napjainkban szerény méretű.) Magyarországon a nyolcvanas évek végétől dr. Kállai László koordinációjával az OMFB biztosította a pályázati háttérrel a legújabb technológiák kifejlesztésére, hazai adaptálására, amit a hazai állatnemesítők már az évtized közepétől szorgalmaztak (DOHY, 1988). A kutatók eredményeikről az Állatbiotechnológiai Kerekasztal Konferenciákon számolhattak be, és az állattenyésztő szakma is ezen a fórumon kaphatott hírt az aktuális technológiai fejlesztésekről. A hazai biotechnológiai kutatásra a rendszerváltozást követő ágazati kollapszus rendkívül kedvezőtlenül hatott, a laboratóriumi kísérletekben kidolgozott eljárások gyakorlatban történt kipróbálására a nyolcvanas évekhez képest nagyon kevés gazdaság nyújtott lehetőséget. A technológiai fejlesztésre - a források korlátozott volta miatt - nem volt módjuk. Így üzemi kísérletekre ritkán kerülhetett sor. Ez sok esetben tudományos műhelyek széthullását és a kutatók külföldre való távozását eredményezte. A kutatást végzők a gazdaságok támogatása, megbízása nélkül laboratóriumi modellrendszereken kezdtek dolgozni, várva az ágazat megerősödését, hogy kísérleti eredményeikre támaszkodva a gyakorlat számára végezhesseknak újra fejlesztő munkát.

Dolgozatomban olyan, az *in vitro* embrió-előállítás és a PGD alkalmazhatóságát szolgáló laboratóriumi kísérleteket, módszereket és eredményeket ismertetek, amiket felhasználva, amennyiben a tenyésztési rendszerek kidolgozói ezeket a beavatkozásokat igénylik, megkezdődhetnek az üzemi kísérletek, és a gyakorlati alkalmazással a laboratóriumi, módszertani kísérletek új értelmet kaphatnak.

3. A SZARVASMARHA *IN VITRO* EMBRIÓ-ELŐÁLLÍTÁS MÓDSZEREI ÉS FELHASZNÁLHATÓSÁGA

3.1. Az *in vitro* termékenyítés biológiai alapjai - irodalmi áttekintés

A szarvasmarha *in vitro* embrió-előállítás nem jöhetett volna létre a humán *in vitro* embrió-előállítás módszerének kidolgozása nélkül. A meddőség leküzdésére alkalmazott terápiás eljárás érdekében végzett rendkívül intenzív kutatómunka 1978-ban hozta meg gyümölcsét, amikor Louis Brown, a világon az első, *in vitro* fertilizáció segítségével fogant gyermek megszületett (STEPTOE és EDWARDS, 1978). A laboratóriumi egér és hörcsög modellen kifejlesztett módszerek a kutatás „melléktermékeként” az állattenyésztés számára is felhasználható, nagy tömegű embrió előállítására alkalmas eljárássá válhattak. Már 1977-ben sikerült szarvasmarha petesejteket laboratóriumi környezetben *in vitro* termékenyíteni (BRACKETT és mtsai, 1977; IRITANI és NIVA, 1977). Az első sikeres humán programot követően alig három évvel, 1981-ben megszületett az első *in vitro* termékenyítéssel létrehozott borjú (BRACKETT és mtsai, 1982). A kísérlet során a donor ovulációját követően petevezetőkől kimosott petesejteket termékenyítettek friss bikaspermával, majd az embriókat a fejlődés korai szakaszában sebészi úton recipiens állatok petevezetőjébe ültették. Azonban ekkor még a donor és recipiens állatokat egyaránt terhelő, körülményes sebészeti beavatkozás miatt az eljárás nem kínált egyszerű alternatívát a már megbízhatóan, egyszerűbb és főleg olcsóbb vértelen beavatkozással végrehajtható MOET technológiához képest. Az *in vitro* embrió-előállítás csak úgy válhatott alternatív eljárássá, ha az alkalmazást megelőzően folytatott alkalmazott kutatás lehetőséget teremtett megbízhatóan, hatékonyan és olcsón működtethető embriótenyésztő rendszerek kidolgozására. Ehhez a petesejtek kinyerésének egyszerűsítésére, mennyiségének növelésére, a termékenyítés hatékonyságának növelésére volt szükség. Az új módszerekkel lehetőség nyílt minőségében a MOET embriókkal megegyező, de előállítási költségeit tekintve olcsóbb embriók előállítására. A technológia kidolgozását az alapkutatás is szorgalmazta. Az egérkísérletek módszereit szarvasmarhán is alkalmazni kívánó biotechnológiai kutatások nagyszámú szarvasmarha embriót igényeltek, amit a drága, és a kutatási elvárásnál lényegesen kevesebb embriót produkáló embriómosással nem lehetett már biztosítani.

3.1.1. A petesejtek *in vitro* érlelése

A kérdés megoldását először a petesejtek kinyerésének, és *in vitro* érlelésének megoldásával kellett kezdeni. Bár a vágóhidakról nagy mennyiségben beszerezhető petefészkek gazdag és olcsó petesejtforrást kínálnak, azonban a kinyerhető petesejtek többsége termékenyülésre még nem alkalmas, éretlen állapotban van. Az unipara szarvasmarha petefészkében az ovulációt megelőzően egyszerre több (10-20 db) nagyobb, 2-6 mm átmérőjű tüsző található, melyek közül kialakul a később kilökődő petesejtet tartalmazó domináns tüsző. A tüszőkben a petesejtek a meiózis első osztódási fázisában, osztódási gátlás alatt állnak (HARASZTI és ZÖLDÁG, 1993). A petesejtek csak éretten - amikor a sejt a meiózis második metafázisába kerül és az első sarki test kiválik - lesznek alkalmasak a megtermékenyülésre. Ezért kulcskérdés, hogy a kinyert petesejtek érési folyamata *in vitro* is befejeződjön. A tüszőből kikerülő petesejt a gátlás alól felszabadul és akár spontán is képes elérni az ovulációra jellemző érettséget (PINCUS és ENZMAN, 1935). Az érési folyamat serkenthető az érlelő folyadék (a leggyakrabban használt médium a TCM199) szérum (10% FCS, FBS, vagy OCS) és hormonális kiegészítésével. Az FSH, LH, E2, gonadotrop hormonok közvetve, a petesejtet körülvevő tápláló kumuluszsejteket aktiválják, amik a petesejt citoplazmás és közvetve a nukleáris maturációját szabályozzák (DOWNS, 1993). Hasonló hatás érhető el növekedési faktorok (pl. EGF) hozzáadásával is (HARPER és BRACKETT, 1991). Napjainkban csak a petefészkek 2-6 mm átmérőjű tüszőiből származó petesejteket lehet sikeresen maturáltatni (GORDON, 1994). *In vitro* érlelt petesejtek *in vitro* termékenyítésével 1988-ban hoztak először létre borjakat (GOTO és mtsai, 1988; FUKUDA és mtsai, 1990). A vágóhídon leölt állatok petefészkeinek preantrális tüszőiből, injekciós tűvel való aspirációval, vagy a petefészkek pengével való összeszabdalása segítségével petefészkenként 3-10 petesejt nyerhető ki (CAROLAN és mtsai, 1994). Az állattenyésztés számára nagy tenyésztékű állatokból történő *in vivo* petesejtnyerés az általános MOET programokkal versenyképessé teheti az *in vitro* embrió-előállítás. Ehhez a szintén humán terápiából származó ultrahang diagnosztika, és a humán *in vitro* fertilizációs programokban szokásos petesejt-aspirációs technika nyújtott segítséget (GALLI és mtsai, 2003). Transzvaginális ultrahang segítségével a petefészkeken levő, follikuláris folyadékkal telt tüszők megfigyelhetők, és a berendezésen levő aspirációs tű segítségével a petesejtet tartalmazó tüszőfolyadék leszívható. Az 1995-ben az üzemi

körülményekhez kifejlesztett OPU eljárás üszőkön és teheneken egyaránt, az állatok károsodása, a szaporodásbiológiai státusz romlása nélkül hetente kétszer is elvégezhető (BOLS és mtsai, 1995). A legújabb módszer szerint az akár négy hónapon keresztül tartó programok során, csak a petefészek ciklusához igazodva a tüszőfázisban végeznek petesejtnyerést, elhagyva sárgatest fázisban való aspirációt (PETYIM és mtsai, 2003). Programonként 3-7 petesejt nyerhető ki, melyekből *in vitro* érlelés, és termékenyítés után átültethető embriók nevelhetők.

3.1.2. *In vitro* termékenyítés

3.1.2.1. A termékenyítő anyag előkészítése

Akárcsak a petesejteknek, az ejakulációt követően a szeminális plazma gátló hatása alatt álló hímivarsejteknek is át kell esniük egy érési folyamaton, a kapacitáción. A kapacitáció révén a spermium akroszómális membránja megváltozik, a petesejt extracelluláris, glikoproteidek alkotta peteburkának cukor oldalláncaihoz való kapcsolódás kötőhelyei szabadabbá és aktívvá válnak. A spermium mozgásának jellege megváltozik, a felolvasztást követő progresszív előrehaladást hiperaktivitás váltja fel, a fark kígyózó nagy amplitúdójú mozgásokat végez (TATENO és MIKAMO, 1987). A változásokat követően a hímivarsejt képessé válik a megtermékenyítésre. *In vivo* ez a folyamat a spermiumoknak a női genitális traktusán való áthaladása során, néhány óra alatt bekövetkezik (AUSTIN, 1952). Az eredményes *in vitro* termékenyítés egyik alapfeltétele, hogy spermiumokban a kapacitáció laboratóriumi, definiált körülmények között is végbemenjen. A termékenyítéshez mélyhűtött spermát alkalmazva gondoskodni kell a spermahígító eltávolításáról, és a mélyhűtés okozta károsodások miatt a motilis sejtek arányának növeléséről is. A spermahígítót többszöri, egymást követő fiziológiás oldattal való átmosással és a mosást követő centrifugálással való ülepítéssel, majd a csapadék friss oldatban való átöblítésével viszonylag egyszerűen el lehet távolítani (LU és GORDON, 1987). A fagyasztási sérüléseket is tartalmazó spermamintából a motilis, élő sejtek kiválogatására több, a humán gyakorlatból származó módszert – pl. üveggyapoton való szűrést (SEMPLE és mtsai, 1993), Percoll gradienssel történő centrifugálást (ROSENKRANS és mtsai, 1993), valamint a swim-up technikát (PARRISH és mtsai, 1986) - is fel lehet használni.

A kapacitáció mesterséges kiváltásához az *in situ*, a petevezető váladékában talált, heparinhoz hasonló struktúrájú glükózaminoglükán vegyületek hatásának szimulációjához a petesejteket is tartalmazó termékenyítő oldatot, leggyakrabban a módosított, laktáttal és szarvasmarha szérum albuminnal (BSA) kiegészített Tyrode médiumot (TALP médium) használnak (BAVISTER és YANAGIMACHI, 1977), amit heparinnal egészítenek ki (FIRST ÉS PARRISH, 1987). A petesejteket *in vivo* alig pár hímvarsejt éri el (HUNTER, 1993), ezért *in vitro* termékenyítés alkalmával a termékenyülést még biztosító, de polispermiát még nem okozó optimális termékenyítési koncentrációban kell a spermát a petesejtekhez adni. A tapasztalatok szerint a kívánatos 3000-4000 spermium/petesejt arányt az 1-1,5 millió hímvarsejt/ termékenyítő oldat ml koncentrációt biztosítja (MADISON és mtsai, 1991), amit hematocitóméterrel történő sejtsűrűség meghatározást követő hígítás segítségével lehet beállítani.

3.1.2.2. A megtermékenyülés folyamata

A petesejt megtermékenyülése egymással kölcsönhatásban lévő több lépés egymást követő sorozata. Az érett petesejteket körülvevő, hialuronsavval egymáshoz kapcsolódó kumuluszsejtek között, hialuronidáz enzim segítségével a kapcsolatokat feloldva áthaladó hímvarsejtek az akroszómán található kötőreceptorok segítségével a petesejt zona pellucidájának ZP3-as fehérje cukor-oldalláncaihoz kötődnek, ami kiváltja az akroszómareakciót. Az akroszóma proteáz tartalma az akroszómát részlegesen emészt, és a feji résszel beékelődő hímvarsejt az erős farokmozgás segítségével keresztül halad a glükoproteid mátrixon. A perivitellinális térbe kerülve szabaddá válnak a posztakroszómális membránon található kötőhelyek, amelyekkel a spermium feje a petesejt membránjához kötődik, majd a fej a farok mitokondriumhüvelyt tartalmazó középdarabjával együtt az oolemmába süllyed. A membrán fúzió megindítja a petesejt termékenyülési reakciósorozatát. Az oszcilláló intracellularis Ca^{++} szint és pH emelkedéssel járó aktiváció hármas szerepet tölt be. A petesejt kortikális vezikulumainak a perivitellinális térbe történő exkréciója miatt a zona pellucida fizikokémiai megváltozása, és a petesejt membránjának strukturális módosulása miatt elveszíti a spermium kötő képességét, megakadályozva több hímvarsejt bejutását. A petesejt felszabadul az érési folyamat második gátlása alól és a második sarki test kiválásával a meiózis befejeződik. Az oolemmában a petesejt, a bejutott dekonzenzáldó hímvarsejt feje által hordozott genetikai

anyagot felkészíti a petesejt genetikai anyagával való egyesülésre, kialakítva az előmagvakat, amelyek a citoplazmában egymáshoz vándorolnak, majd az egyrétegű membránok fuzionálnak. Bekövetkezik az anyai és apai kromoszómák párosodása, a DNS duplikációja, majd a spermium fark nyaki részéből származó centroszómák segítségével kialakított sejtmagorsó szétválasztja a kromoszómákat. A két, diploid kromoszómaszerelvényt sejtmaghártya burkolja be, a citoplazma befűződik és végbemegy a zigóta első mitotikus osztódása. *In vitro* körülmények között az első kétsejtes embriók 26-43 órával a termékenyítés kezdete után jelennek meg (GORDON, 1994). Mélyhűtött-felolvasztott spermával az *in vitro* érlelt petesejtek 80-90%-a termékenyíthető és az osztódási arány (osztódott zigóták/termékenyített petesejtek) elérheti a 60-80%-ot (MERMILLOD és mtsai, 1992).

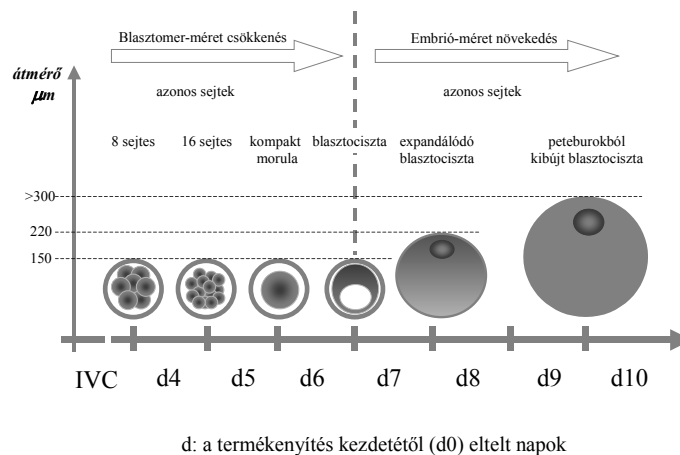
3.1.3. *In vitro* embriótenyésztés

Az osztódó embriók számára szükséges tápanyagokat és energiaforrást az embriótenyésztő tápoldatok biztosítják. Az első három osztódási ciklusban a szarvasmarha embriók génexpressziója nem számottevő, csupán transzlációs aktivitása van - az osztódás a petesejt éréskor a citoplazmába juttatott maternális faktorok, mRNS alapján a citoplazmában képződő fehérjék segítségével történik. Nyolc-sejtes fejlődési állapotban kezdődik meg saját genom transzkripcionális aktivitása, átvéve a fejlődés irányítását (JONES és FIRST, 1990). /A saját genom működésének kezdete fajonként különböző, egérnél már az embrió két-sejtes korában megkezdődik (HOGAN és mtsai,1994)/. Ez az állapot az embriótenyésztés legkritikusabb szakasza, mert nem megfelelő környezetben az osztódási folyamat leáll, és kialakul az ún. fejlődési blokk (GORDON, 1994). Ezt a fejlődési gátlást a tenyésztőrendszerek a feltételek optimalizálásával igyekeznek kiküszöbölni. Az embriókat csoportosan nevelve, segítő sejtkultúrák, társ-sejttenyészetek (pl. kumulusz sejttenyészet, petevezető epitheliális sejttenyészet) ún. kokultúra felhasználásával az osztódási blokk leküzdhető. Az osztódás sebességét a 2. táblázat szemlélteti.

Osztódási ciklus	Fejlődési állapot	Osztódási ciklus hossza (óra)	Termékenyítés kezdetétől eltelt idő (óra)
I.	2 sejtes	28-36	28-36
II.	4 sejtes	6-14	42
III.	8 sejtes	18	60
IV.	16 sejtes	42	102

2. táblázat: A preimplantációs fejlődés első négy osztódási ciklusának időbeli lefolyása (VAN SOOM és mtsai, 1992)

Az első négy osztódás közül a negyedik a leghosszabb, ami alatt a saját genom megkezdí aktív működését. Az embriótenyésztés ötödik napján a 32 sejtes szedericsírák szorosan egymáshoz tapadnak, megkezdődik az embrió kompaktálódása. A belső sejtek elfolyósodásával kialakul a blasztocöl, és létrejön a kétféle sejtípus (trofektoderma, embriócsomó) alkotta hólyagcsíra. Az embrió a hólyagcsíra belső üregében felgyülemlt folyadék feszítő hatásának engedelmesskedve a térfogatát megnöveli, expandálódik. A további tágulásnak ellenállni már nem képes zona pellucida az embriótenyésztés kilencedik, tizedik napján felreped és az embrió a nyíláson keresztül kibújik (12. ábra).



12. ábra: Az embrió *in vitro* fejlődésének üteme, és méretbeli növekedése (saját megfigyelés alapján)

Az ideális tenyésztőmedium megválasztása döntően befolyásolja az embriótenyésztés hatékonyságát. A tápanyagokat, energiaforrást szolgáltató médiumokat (szintetikus petevezető folyadék, SOF; TCM199) szarvasmarha szérummal egészítik ki. Kémiai összetételében teljesen ismert, definiált tenyésztőmediumok (CR1aa, KSOM, SOFaaci) előállítása érdekében a szérum helyettesítésére szérum albumint, polivinil alkoholt, vagy polivinilpirrolidont is alkalmaznak (FANCSOVITS és mtsai, 1998). Az embriótenyésztést 5% CO₂-t tartalmazó gázelegyben végzik, SOF esetén a légköri oxigén szintjét szintén 5%-ra mérséklék, ami csökkenti a tenyésztő kultúrában keletkező szabad oxigéngyökök okozta oxidatív stresszhatást (ROSENKRANS és FIRST, 1991).

Egy jó hatékonysággal működő szarvasmarha *in vitro* embrió-előállító rendszernek több felhasználási területe is van. Az alkalmazott embriológiai kísérletek számára nyersanyagot állíthat elő, de *in vivo* petesejt kinyerési módszerrel kombinálva a modern MOET eljárásokban állatnemesítési és kereskedelmi célra is felhasználható. A szaporító anyag *in vitro* funkcionális jellemzése számára az *in vitro* fertilizáció egy mérési rendszert szolgáltathat, de veszélyeztetett fajták embriótechnológiai génmegőrzési szerepét is betöltheti.

Magyarországon a szarvasmarha *in vitro* embrió-előállítás technológiájának hazai adaptációját és fejlesztését dr. Vajta Gábor és munkacsoportja a gödöllői Mezőgazdasági Biotechnológiai Kutatóközpont dr. Solti László vezette Állatbiotechnológiai Intézetében kezdte meg (1990-1993) (VAJTA és mtsai, 1991; VAJTA és mtsai, 1992; VAJTA és SOLTI, 1992). Szintén ezen a kutatási területen dolgozott dr. Seregi János és dr. Cseh Sándor csoportja az Állatorvostudományi Egyetem kísérleti telepén, Dóramajorban. Az *in vitro* embrió-előállítás génmegőrzésére való alkalmazhatóságát is sikeresen demonstrálták. Levágott magyar szürkemarkarha petefészkéből származó petesejtek *in vitro* termékenyítésével létrehozott embriókat recipens anyákba ültettek, és a vemhesség végén sikerült egészséges magyarszürke borjat a világra segíteni (BÁRÁNDI és mtsai, 1992; BÁRÁNDI és mtsai, 1993). 1993 és 1997 között az *in vitro* embrió-előállító rendszer sejtmag-átültetési klónozáshoz és petesejt aktivációs, alapkutatás jellegű kísérletekhez szolgáltatott petesejteket (BODÓ és mtsai, 1996; BODÓ és mtsai, 1998a; DINNYÉS és mtsai, 1997; DINNYÉS és mtsai, 1998). A technológiát, a lépések összetett, sok tényező által befolyásolt volta miatt, azóta is folyamatosan fejlesztjük. 1998-ban kezdődött meg a

bikasperma *in vitro* fertilizációs rendszerben való funkcionális tesztelése (BODÓ és mtsai, 1998b; BODÓ és mtsai, 2000a; BODÓ és mtsai, 2000b; BODÓ és mtsai, 2002a; BODÓ és mtsai, 2002b; SOMFAI és mtsai, 2002; NÁNÁSSY és mtsai, 2003; SZABARI és mtsai, 2003).

3.2. A Mezőgazdasági Biotechnológiai Kutatóközpont *in vitro* szarvasmarha embrió-előállító rendszerének ismertetése

2000-ben, a Mezőgazdasági Biotechnológiai Kutatóközpont Embriológiai Laboratórium keretén belül működő, EU konform, OMMI által regisztrált embrió-előállító állomás (H-03) embriótenyésztési protokolljának, technológiájának kidolgozása volt a feladatom. Az állomás felelős üzemeltetőjeként Vajta Gábor, Neal First és Peter Holm (az irodalomból megismert) módszereire (VAJTA és mtsai, 1991; FIRST és PARRISH, 1987; HOLM és mtsai, 1999) és saját tapasztalatokra támaszkodva alakítottam ki a bemutatandó eljárást. Az embrió-előállító rendszernek több felhasználási cél kielégítésére is alkalmassá kellett válnia.

Egy olyan rendszert kellett létrehozni, amely egyaránt szolgálja

- az alapkutatót, kísérleti objektumok létrehozásával
- a génmegőrzést, embrióbank számára történő embrió-előállítással
- a termékenyítőanyag előállítását, a termékenyítőanyag funkcionális tesztelésére alkalmas *in vitro* termékenyítő rendszer segítségével
- a gyakorlat számára történő *in vitro* embrió-előállítást

3.2.1. Az *in vitro* embrió-előállító laboratórium alapfelszereltsége

Egy hatékony és a bejegyzési feltételeknek megfelelő rendszerhez szükséges egy több munkatérből álló, a környezetétől jól elkülönülő laboratórium. A vágóhídról származó petefészekből a petesejtgyűjtést az embrió-előállító munkaterülettől lehetőleg elkülönítve kell végezni, az esetleges szennyeződések miatt. A laboratóriumban létre kell hozni egy munkaterületet a tápfolyadékok összeméréséhez. A munkafeladathoz analitikai mérleg (Sartorius), a szükséges vegyszerek (túlnyomórészt Sigma), pH mérő (WPA), ozmométer (Osmomat), mérőlombikok és mérőhengerek, mágneskeverő, automata pipetták (Gilson,

1 μ l – 5000 μ l) egyszer használatos, 0,2 μ m pórusméretű folyadékszűrők, és steril és egyszer használatos steril műanyag csövek (10-15 ml) szükségesek (13., 14. ábra).



13. ábra: Oldatkészítő munkaasztal 14. ábra: pH és ozmolaritásmérő műszerek

Egyes tápfolyadék összetevőket törzsoldat formában, mélyhűtve tárolunk a végleges médium elkészítéséig (pl. antibiotikum – gentamicin, penicillin, streptomycin törzsoldatok, heparin törzsoldat, FCS, laktáttal kiegészített Tyrode törzsoldatok, hormonok és növekedési faktorok törzsoldatai). A petesejtek érleléséhez (TCM 199+2 μ g/ml FSH, 1 μ g/ml E_2 , 10 ng/ml EGF+10%FCS), a termékenyítéshez (Sperm-TALP, IVF-TALP), és az embriótenyésztéshez (TCM 199+10%FCS, vagy SOFaaci+5% FCS) törzsoldatok felhasználásával a médiumokat frissen állítjuk elő (legfeljebb egy héten keresztül tárolhatók, 4 °C-on).

A petesejtek és embriók mozgatását, kezelését teljesen izolált, steril munkatérben végezzük. A sterilitást HEPA szűrőkkel felszerelt lamináris fülke (BDK UVF 6.02 S) biztosítja. Az beavatkozásokat sztereo mikroszkóp (Olympus) alatt végezzük, fűtött tárgyasztalokon (MiniTüb) (15. ábra).



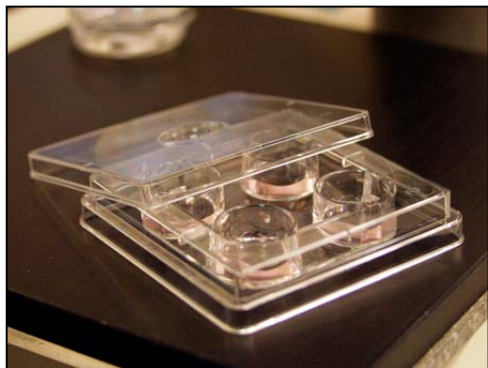
15. ábra: Lamináris fülke sztereo mikroszkópokkal és melegítőasztalokkal



16. ábra: Tenyésztőedények, transzfer pipetták

A petesejtek, embriók kezelését – mosás, tenyésztés - egyszer használatos műanyag edényekben (NUNC, Greiner) végezzük. A sejteket szemcseppentőhöz hasonló, hematokrit kapillárisból készített üvegpipettákkal mozgatjuk az oldatok között (16. ábra)

A petesejtek érlelése, a termékenyítés és az embriótenyésztés is a műanyag tenyésztőedényekbe kialakított, olajjal fedett 50-400 μ l térfogatú mikrocseppekben történik (17., 18. ábra)



17. ábra: 400 μ l-es tenyésztőkultúra



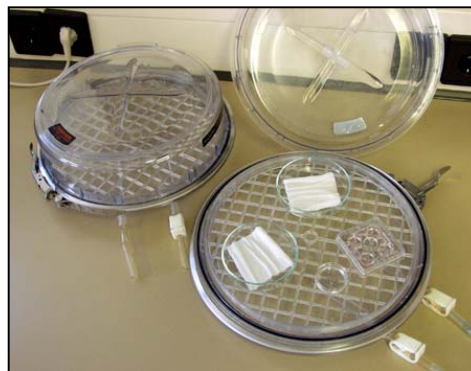
18. ábra: 50 μ l-es tenyésztőkultúra

A tenyésztő kultúrákat 98%-os relatív páratartalmú, 38,5 °C hőmérsékletet, 5% CO₂ koncentrációt biztosító termosztátokban (Hereaus) inkubáljuk. SOF tenyésztőmédium használata esetén csökkentett oxigéntartalmú (5%) gázeleggyel feltöltött, lezárt, mobil

inkubátor kamrákat alkalmazunk, amelyek fűtéséről a CO₂ termosztát gondoskodik (19., 20. ábra)



19. ábra: CO2 termosztát



20. ábra: Mobil inkubátor kamrák

3.2.2. Petesejt kinyerés – *in vitro* petesejt érlelés

A rutin embrióelőállító programok számára a petesejteket vágóhidakon leölt, leggyakrabban Holstein-fríz fajtájú üszők és tehenek petefészkéből nyerjük ki. Nagy tenyészártékű, vagy genetikai értéket képviselő (magyar szürkemarka) esetén a petefészkeket egyedileg gyűjtjük és a donorok alapján azonosítjuk, hogy az embrió-előállító program egész folyamatában az embriók származása egyértelműen követhető legyen (21. ábra). A petefészek 2-6 mm átmérőjű, preantrális tüszőiből 10 ml-es egyszer használatos műanyagfecskendőre rögzített 18G-s injekciós tűvel 6 cm-es steril Petri-csészékbe szívjuk le a tüszőfolyadékot (22. ábra).



21. ábra: Egyedi petefészek gyűjtés



22. ábra: A tüszők aspirációja

A kumulusz sejtekkel több rétegben borított petesejteket TALP-HEPES mosófolyadékban való többszöri átmosás után helyezzük az érlelő médiumba (TCM 199 +FSH, EGF, E2 + 10% FCS), majd az ebben való ismételt átmosás után a petesejteket az érlelődénybe helyezzük (30-40 petesejt/400 µl), és egy napon keresztül inkubáljuk 5% CO₂ , 98 %-os relatív páratartalom mellett, 38,5 °C-on. Az érlelést követően a petesejtet körülvevő kumuluszsejtek közötti kapcsolatok fellazulnak, a petesejtek többsége (80-90 %) eljut a meiózis II. metafázisáig, és a sarki test kiválása megfigyelhető.

3.2.3. *In vitro* termékenyítés

A program második napján végezhető *in vitro* termékenyítés folyamata két lépésből áll. A sperma előkezelése a mélyhűtött műszalma felolvasztásából, spermahígítótól való megszabadításából, a motilis termékenyítőanyag előállításához a motilitás szempontjából végzett sejtszelekcióból, a minta minőségének meghatározásából, és a termékenyítő koncentráció meghatározásából áll. Az embriótenyésztés kezdőidőpontjában (IVC-d0), a petesejtek termékenyítőoldatba való áthelyezését követően történik a termékenyítés. Az embriók korát ettől az időponttól számítva határozzák meg (hpi: hours post insemination).

3.2.3.1. A termékenyítőanyag előkészítése

A műszalmát egy percen át 37 °C-os vízfürdőben olvasztjuk, majd tartalmát egy 1,5 ml-es Eppendorf csőbe ürítjük. A hígítótól való megszabadítást három különböző módszerrel végezhetjük el: egyszerű spermamosással, vagy olyan, a motilis sejtfrakció kialakítását is elősegítő szelekciós módszerek alkalmazásával, mint a swim up, vagy a Percoll grádiensen történő centrifugálás.

A spermamosás során a műszalma tartalmát 38,5 °C hőmérsékletű Sperm-TALP médiumban 4 ml-re hígítjuk, majd tíz percig 300 g-n történő centrifugálással a hímivarsejtek a 10 ml-es műanyag (NUNC) centrifugacső aljára ülepítjük. A hígítót tartalmazó felülúszót a csapadékról automata pipettával eltávolítjuk, és a friss Sperm-TALP hozzáadásával újra hígítjuk, és centrifugálást megismételjük. A felülúszó eltávolítása után a cső aljában a műszalmában található összes hímivarsejt megtalálható.

A felúsztatási módszer (swim up) lényege, hogy a műszalma tartalmát 1 ml-nyi Sperm TALP médium alá rétegezzük a minta felkavarodása nélkül. Az egy órás inkubáció

során a motilis hímivarsejtek a médiumba úsznak, létrehozva így egy motilis sejtekből álló frakciót, amíg a hígító és a halott, mozgásképtelen sejtek többsége az alárétegzett mintában marad. A felülúszóból 770 μ l-t eltávolítunk, és új centrifugacsőben 3 ml Sperm-TALP médiummal hígítjuk. 10 perc 300 g-n történő centrifugálás után 50-100 μ l-t meghagyva a felülúszót eltávolítjuk, és a motilis spermafrakciót alkotó csapadékot a maradék médiummal felhígítjuk.

A Percoll grádienshez 90%-os és 45%-os Percoll oldatokat készítünk. A 90%-os Percoll oldatot 10 ml, tízszeres töménységű Sperm TL 90 ml Percollhoz (Pharmacia) adásával alakítjuk ki. A 100 ml-nyi oldatot 29 mg CaCl_2 (Sigma C 7902), 8 mg MgCl_2 ($6\text{H}_2\text{O}$)(Sigma M 2393), 368 μ l lactic acid (Sigma L 7900) és 109 mg NaHCO_3 (Sigma S 5761) hozzáadásával egészítjük ki. A 45% Percoll oldatot a 90%-os oldat Sperm TALP-pal való kétszeres hígításával készítjük el. A grádiens kialakításakor 10 ml-es centrifugacsőben a 2 ml 90%-os Percoll oldat fölé rétegzünk 2 ml 45%-os Percoll oldatot, vigyázva a rétegek határfelületének épségére. A 170-150 μ l-nyi spermamintát a 45%-os Percoll tetejére adagoljuk. Az elkészített grádiens 10 percig 300 g-n centrifugáljuk. Ezalatt a motilis sejtek a cső aljába kerülnek, a halott sejtek pedig a két réteget elválasztó határrétegben gyűlnek össze. A 100 μ l-nyi csapadékot eltávolítjuk, Sperm-TALP-ban újrähígítjuk és megismételjük a centrifugálást. A felülúszót eltávolítva kapjuk meg a motilis sejteket tartalmazó termékenyítő anyagot.

3.2.3.2. A gaméták koinkubációja

Az előkezelésen átesett termékenyítő anyagot $1-1,5 \times 10^6$ koncentrációban adjuk az IVF-TALP termékenyítőmédiumban levő petesejtekhez, és a gamétákat legfeljebb 22-24 órán keresztül koinkubáljuk. A termékenyítés elején a hímivarsejtek kapacitálódnak, majd megtermékenyítik a petesejteket. A koinkubáció 5% CO_2 , 98 %-os relatív páratartalom mellett, 38,5 °C-on történik.

3.2.4. *In vitro* embriótenyésztés

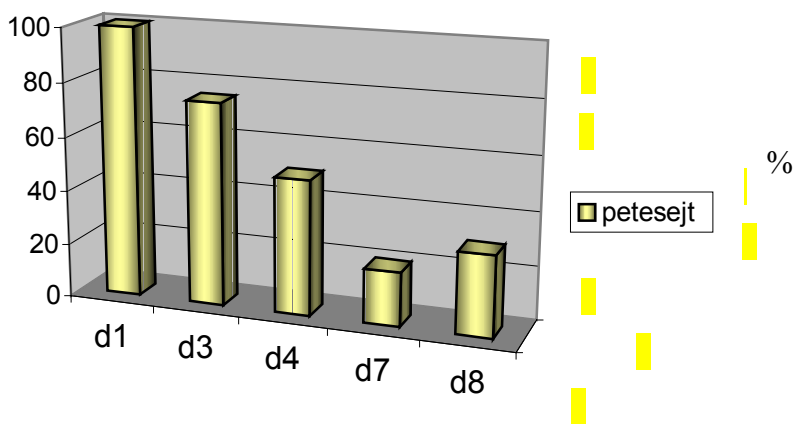
A termékenyítést követően a petesejteket 80 μ l-nyi 38,5 °C hőmérsékletű TALP-HEPES mosó folyadékot tartalmazó 1,5 ml-es steril Eppendorf csőbe rakjuk, majd másfél percig tartó vortexeléssel eltávolítjuk a zigóták zona pellucidájához tapadó

kumuluszsejteket. Mielőtt az előzőleg equilibrált tenyésztőkultúrába helyezzük, a megtisztított embriókat háromszor keresztül öblítjük a TALP-HEPES cseppeken, majd a tenyésztőmédiumból készített mosócseppen. Az embriótenyésztéshez kétféle tápfolyadékot használtunk fel.

TCM 199 alapmédiom használatakor 10% FCS-sel egészítjük ki az oldatot. Ebben a rendszerben az embriók fejlődésének serkentésére, elősegítésére társsejt-kultúrát alakítunk ki a tenyésztőedény aljára egy-rétegben letapadó, a vortexelésnél leválasztott kumuluszsejtekből. A tenyésztőedényt 5% CO₂, 98%-os relatív páratartalom mellett, 38,5 °C-on tároljuk.

A SOF alapmédiomot használva HOLM és mtsai által 1999-ben leírtak alapján az oldatot esszenciális, nem esszenciális aminosavakkal, citráttal és mioinozitollal, és 5% FCS-sel egészítjük ki. Az embriókat mobil inkubátorkamrákban csökkentett, 5% O₂ koncentráció mellett tenyésztjük 7-10 napig.

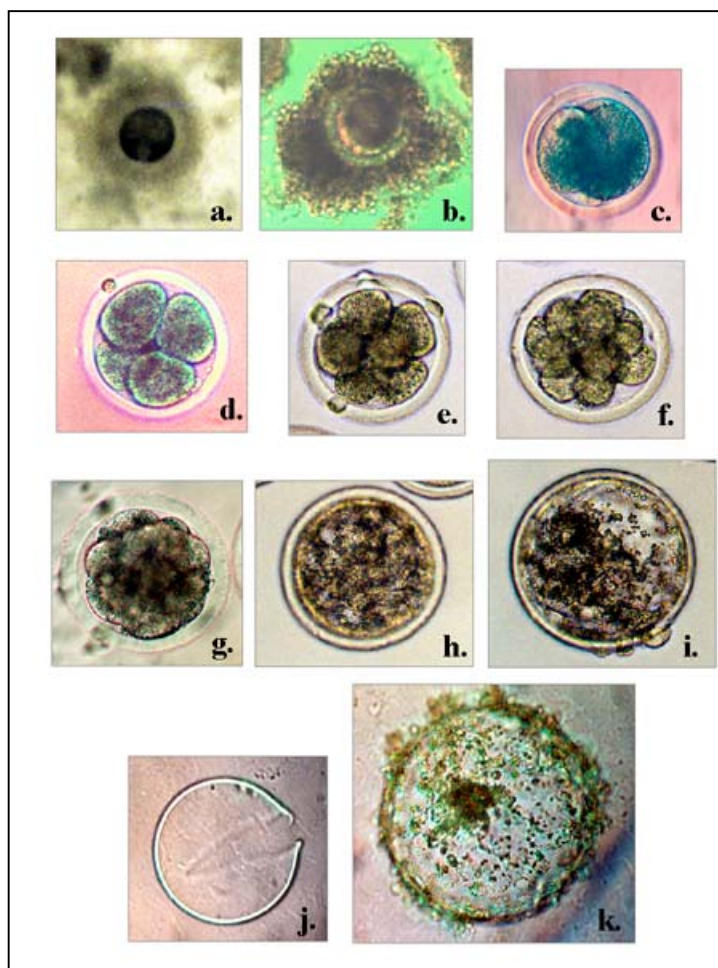
A termékenyítés sikerességét az embriótenyésztés harmadik napján (d3) az osztódási % (osztódott embriók/termékenyített petesejtek*100) alapján határozzuk meg. Az embriótenyésztés hatékonyságát a tenyésztés hetedik, nyolcadik (d7, d8) napján a termékenyített petesejtszámhoz viszonyított blasztociszta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



23. ábra: Az *in vitro* embrió előállítás veszteségei.

A termékenyített petesejteknek csak egy része képes beültethető hólyagsíra állapotig fejlődni. Minden egyes osztódási ciklusban a rendszerben veszteségek lépnek fel, és a tenyésztés végén legfeljebb csak minden harmadik termékenyített petesejtből válik

blasztociszta. A veszteségek számításakor a petesejtek számához viszonyítottuk az adott fejlődési stádiumot elért embriók mennyiségét (23. ábra). A tenyésztés nyolcadik napján a blasztociszták aránya kicsit emelkedik, ami egyes embriók fejlődési késéséből következik. A fejlődési állapotokat a 24. ábra mutatja be.



24. ábra: Fontosabb *in vitro* embriófejlődési állapotok.

a.: érett petesejt kumuluszsejtekkel (d0), b.: termékenyített petesejt hímivarsejtekkel (d1), c.: két-sejtes embrió (d2), d: négy-sejtes embrió (d3), e: nyolc-sejtes embrió (d3), f: 16 sejtés embrió (d4), g: kompaktálódó morula (d5), h: blasztociszta (d6-d7), i: expandált blasztociszta (d7-d8), j: felrepedt peteburok (d9), k: kibújt blasztociszta (d9-d11) (Saját felvételek)

Az *in vitro* szarvasmarha embrió-előállítás lépéseit oktatási célból bemutató web oldalaink (<http://www.abc.hu>) 1996 óta találhatók meg az Interneten. A site megjelenésekor a világon

az egyik legelső összefoglaló jellegű on line metodikai leírás volt ebben a témakörben (BODÓ és BARANYAI, 1996).

3.3. Az embrió-előállító rendszer hatékonyságának növelésére irányuló kísérletek

Az *in vitro* embrió-előállító rendszer gyakorlati, illetve génmegőrzési célú alkalmazása olyan módszertani változtatások bevezetését tételezi fel, amelyek segítségével lehetőség nyílik egyedileg azonosított embriók előállítására. Az alapkutatási célokat kielégítő, a származást figyelmen kívül hagyó, vágóhídról származó petefészekből származó petesejtekből embriókat tömegesen előállító rendszerrel szemben ekkor a nagyértékű (élő, vagy levágott) donoroktól származó petesejtek csak korlátozott számban állnak rendelkezésre. A petesejt csoportokat az embrió-előállítás egész folyamatában elkülönítve kell kezelni. Hogy a donoronkénti petesejtcsoportokból minél több embriót tudjunk előállítani, a petesejtkinyerés és az embriótenyésztés hatékonyságát is növelni kívántuk.

3.3.1. Petesejt kinyerés optimalizálása

3.3.1.1. Célkitűzés

Egy *ex situ* génmegőrzés céljából kialakítandó embrióbank által megkívánt egyedi nyomonkövethetőség modelljéül magyar szürkemarha üszők, illetve tehenek petefészekéből való egyedi petesejtgyűjtés szolgált. A génrezerv embriókészlet létrehozásakor fontos elvárás, hogy a vágódon leölt állatok petefészekéből minél több petesejtet lehessen kinyerni. 2002 őszén üszők és a tehenek petefészekéből injekciós tűvel történő aspirációval kinyerhető petesejtek mennyiségét tanulmányoztuk.

3.3.1.2. Anyag és módszer

A gyöngyösi Falco Trade Rt. szarvasmarha-vágóhídján levágott magyarszürke fajtájú üszökből (hat 6-8 hónapos állat) és tehenekből (12 tíz évnél is idősebb állat) a petefészeket a vágási folyamaton a zsigerek eltávolításáig, a fűlszám alapján végigkövetve, állatonként elkülönítve távolítottuk el.

A petefészkeket testmeleg fiziológiás sóoldatban átmostuk, majd hordozható hűtőtáskában a testhőmérséklet fenntartása mellett, PBS-oldatban a laboratóriumba szállítottuk. Az első állat levágástól a petesejtek leszívásig három óra telt el. A petefészkek felszínén található 2-6 mm átmérőjű follikulusokat aspiráltuk. A petefészkekről hosszmeretet vettünk fel. A petesejteket petefészkenként elkülönítve 3,5 cm átmérőjű Petri-csészékben, TALP-HEPES mosófolyadékba gyűjtöttük és leszámoltuk.

3.3.1.3. Eredmények

A kísérlet eredményeit a 3. táblázatban foglaltuk össze.

	átl. hosszmeret, cm (A.)	petefészkenkénti átl. tüszőszám (B.)	petefészkenkénti kinyert átl. ps. szám (C.)	tüszőnként kinyerhető petesejtek %-os aránya* (D.)
üszők	2,4 ±0,4 ^a	8,6 ±3,9 ^a	4,5 ±2,3	52,2 ^a
tehenek	4,2 ±0,6 ^b	15,2 ±7,6 ^b	5,9 ±4,1	38,1 ^b

3. táblázat: A vágóhídon leölt állatok petefészkeiből való petesejtkinyerés mutatói
A kis betűk azt oszlopok adatai közti statisztikailag igazolható szignifikáns eltérést jelölik.

P<0,05 Statisztikai próba: student t-próba A., B., C. oszlopok, Chi² próba D. oszlop

Zárójelben a minták szórását jelöltük. (:100% = megszűrt tüszők száma)*

3.3.1.4. Következtetések, javaslatok

Összehasonlítva az üszők és a tehenek adatait, megállapítható, hogy a tehenek petefészkeinek mérete jelentősen, kb. kétszer nagyobb volt a még nem ivarérett üszökhöz viszonyítva. A szemmel megfigyelhető tüszőszám (3 mm-nél nagyobb átmérő) is majdnem kétszer több volt, bár tehenek esetében jelentős eltérést tapasztaltunk az egyes petefészkek között. A petefészkenként kinyerhető petesejtszám tekintetében az eltérést statisztikailag nem tudtuk igazolni. Habár a tehenek petefészken több tüszőt találtunk, az üszők petefészkeiből nagyobb hatékonysággal lehetett petesejteket kinyerni.

Az adatok alapján úgy számoljuk, hogy levágott állatonként 9-10 petesejtet tudunk injekciós tűvel végzett aspirációval a két petefészek tüszőiből kinyerni. Az *in vitro* embrió-

előállítás hatékonysági elemzése alapján állatonként 2-3 beültetésre alkalmas embriót tudunk rendszerünkben előállítani, s így levágott állatonként egy-két nőivarú embrió létrehozásával számolhatunk. Etilén glikolt alkalmazó, vitrifikációs mélyhűtést követő embrióbeültetést alkalmazva, SOMMERFELD és NIEMANN 1999-ben közzétett kísérletei eredményei alapján 43% vemhesség érhető el. *Ex situ* génmegőrzést szolgáló embrióbankban kialakítandó embrióállomány méretének tervezésekor figyelembe kell venni, hogy így tíz donor állattól legalább 4, legfeljebb 9 üszőborjút állíthatunk elő.

3.3.2. Két in vitro tenyésztőrendszer hatékonyságának elemzése

A kilencvenes évek közepéig, amikor az embrió-előállítás csupán vágóhídi petefészkekből kinyert petesejtek termékenyítésével történt, és a nagy számban rendelkezésre álló petesejtekből nagyobb csoportokat (30-40 petesejt/ érlelő kultúra) lehetett létrehozni, a TCM 199 alapú médiumok használata igen elterjedt volt. A médium előnye, hogy a mind *in vitro* petesejt érlelésre, mind embriótenyésztés számára felhasználható TCM 199 készen vásárolható, embriótoxicitásra gyárilag tesztelt tápfolyadék, amit a felhasználás helyén csupán FCS-sel kell kiegészíteni. Miután megkezdődött az OPU kereskedelmi jellegű alkalmazása 1996 körül, felmerült egy olyan tenyésztő rendszer kialakításának az igénye, amelyik részben hatékonyabb, mint a TCM 199, valamint alkalmas a kis csoportokban történő embriótenyésztésre. A szérumszerű kiegészítés és a tápláló sejtkultúra elhagyásával csökkenthető az *in vitro* embriókból fejlődő borjak esetén megfigyelt, nagyobb születéskori testtömegből adódó nehézellés (un. large offspring syndrome) kockázata is (VAN WAGENDONK-DE LEEUW és mtsai, 1999). Saját tapasztalatok szerint a laboratóriumunkban 2001-ig általánosan használt TCM 199 alapú médium még granulózus tápláló sejtréteggel kiegészítve sem alkalmas arra, hogy embriószexuális programokban, a genetikai analízis során az egyedileg elkülönített embriók továbbfejlődését biztosítsa.

3.3.2.1. Célkitűzés

Az embriótenyésztő rendszer optimalizálása céljából HOLM és mtsai által 1999-ben publikált embriótenyésztési eljárást adaptáltuk. A kultiváció hatékonyságának növelése

céljából a TCM 199 alapoldat és a SOF oldat embriónevelő képességét hasonlítottuk össze 2002 tavaszán.

3.3.2.2. Anyag és módszer

Az embriótenyésztési adatokat a 2001 és 2002-ben a laboratóriumban végzett rutin embrió-előállító programok szolgáltatták. A petesejtek érlelését és termékenyítését a már ismertett protokoll alapján végeztem. A maturáltatott petesejtek termékenyítéséhez mindig ugyanak a holstein-fríz bikának (Laguna Future 12875, született 1992.04.12., szülei: 11860 Zieldand Fast Future x 09610 Crescentmead Chief Steward) a mélyhűtött termékenyítőanyagát használtuk fel. A termékenyítést megelőzően egyszerű spermamosást alkalmaztunk. A termékenyítő médium minden esetben IVF-TALP volt. A zigótákról a kumuluszsejteket vortexeléssel távolítottuk el. 30-40 embriót tenyésztettünk olajjal fedett 400 µl-es tenyésztőcseppekben. A TCM199 alaplómédiumot 10%FCS-sel, a SOF alaplómédiumot 10µl/ml MEM (100x) törzsoldattal, 30µl/ml BME (50x) törzsoldattal, 0,5 mg/ml Na-citráttal, 0,1 mg/ml myoinozitollal és 5%FCS-sel egészítettük ki. A TCM199 alapoldat használatakor a kumulusz sejtekből monolayerert készítettünk a fertilizáció után. A TCM199 oldatot tartalmazó tenyésztőkultúrát 5% CO₂, a SOF oldatot tartalmazó tenyésztőkultúrát 5% CO₂ és 5% O₂ közegben inkubáltuk. Az embriótenyésztés eredményét a kultiváció hetedik napján bíráltuk el.

3.3.2.3. Eredmények

A petesejt érlelés és a termékenyítés mindkét kezelési csoport esetén azonosan zajlott, és az osztódási arány 70% körüli volt minden programban. Az embriófejlődési adatokat a 4. táblázat tartalmazza.

tenyésztőmédium	Termékenyített petesejtek száma	Blasztociszta aránya tenyésztés 7. napján (%)
TCM 199 + 10% FCS	438	13 ^a
SOFaaci + 5% FCS	1572	23.5 ^b

4. táblázat: Különböző tenyésztőfolyadékok alkalmazásának hatása a blasztociszta arányra

A kis betűk azt oszlop adatai közti statisztikailag igazolható szignifikáns eltérést jelölik.

P<0,05 Statisztikai próba: Chi² próba

3.3.2.4. Következtetések, javaslatok

Eredményeink alapján a SOFaaci + 5% FCS tenyésztőfolyadék majdnem kétszer eredményesebb, mint a TCM 199 + 10% FCS, így laboratóriumunkban áttértünk a SOF használatára a rutin *in vitro* embrió-előállító programokban.

A SOF médium egyetlen hátránya a TCM 199 médiumhoz képest, hogy sok komponensből, több törzsoldat felhasználásával, saját kezűleg kell elkészíteni. A művelet költséges és időigényes, a frissen elkészített tápoldat csak rövid ideig (legfeljebb egy hét) tárolható.

A laboratóriumunkban elért 30% alatti átlagteljesítménnyel azonban nem lehetünk elégedettek, mert a szakirodalomban ennek a rendszernek a használatával 35-40% körüli eredményekről is beszámolnak. 1999-ben az Agricultural Research Centre embriológiai laboratóriumában skandináv ayrshire embriók *in vitro* tenyésztésekor SOFaaci + 5% FCS használatával 30% hólyagsíra arányt tudtam elérni. Az eredmények közötti különbség vágóhídról származó petefészkek minőségi különbségéből adódhat. Magyarországon túlnyomó többségben szaporodásbiológiai rendellenességek miatt küldik az állatokat a vágóhídra, ami a petefészkek egészségi állapotán egyértelműen meglátszik. A petefészkek többségén elfajult tüszőciszták találhatók, amik jelenléte jelentősen ronthatja a kinyert petesejtek minőségét.

Embrió-előállító rendszerünk hatékonyságát tovább lehetne növelni jobb *in vitro* fertilitású (80-90% osztódási arányt elérő) termékenyítőanyag alkalmazásával, és a petesejtek érlelés előtti szigorúbb minőségi bírálaton alapuló szelekciójával.

3.4. A termékenyítőanyag funkcionális jellemzésének lehetősége az *in vitro* fertilizáció módszereinek segítségével

A laboratóriumunkban kialakított embrió-előállító rendszer a gyakorlati alkalmazási, génmegőrzési felhasználás mellett alkalmas arra is, hogy termékenyítőanyagot funkcionálisan értékeljünk vele, megállapítva egy adott minta *in vitro* termékenyítőképességét. Az *in vitro* tesztelés elemévé válhat a mesterséges termékenyítés

gyakorlatában eddig már alkalmazott vizsgálati módszereknek. A szakirodalomban több közlemény is olvasható arról, hogy *in vitro* laboratóriumi környezetben végzett funkcionális tesztek segítségével (pl. peteburok kötődési teszt, *in vitro* termékenyítés) kívánják a tenyészbikák adott ejakulátumából kialakított termékenyítőanyag későbbi, üzemi termékenyítőképeségét előre megjósolni (RODRIGUEZ-MARTINEZ és mtsai, 1996; ZHANG és mtsai, 1999). A termékenyítőanyag *in vitro* fertilitásának előjelzése is fontos lehet, mert gyakorlati célú embrió-előállítás esetén a célpárosítások alkalmával a különböző donoroktól származó petesejteket különböző tenyészbikától származó termékenyítőanyaggal termékenyítik. A bikák között az *in vitro* termékenyítés tekintetében jelentős különbségek adódnak (GORDON, 1994). Ahhoz, hogy a megfelelő bikákat kiválasszák, a gyakorlatban előzetes teszttermékenyítéseket kell végezni *in vitro*, több ismétlésben. A költséges teszttermékenyítések kiváltása érdekében célszerű lenne egy olyan vizsgálati eljárást kidolgozni, amivel az *in vitro* fertilitás előre jól jelezhető lenne.

Kísérleteinkben a mesterséges termékenyítés hagyományos vizsgálati módszereivel, a hímivar-sejtek mozgékonyságának meghatározásával, valamint a sejtek fénymikroszkópos festésével tanulmányozni kívántuk az *in vitro* termékenyítés felúsztatási eljárás hatását, jellemezve az eljárással létrehozott termékenyítőmintákat. Ezt követően a mintákkal elvégeztük a teszttermékenyítéseket, és a kapott eredményeket összevetve összefüggést kerestünk a termékenyítési és a hagyományos vizsgálati eredmények között. Amennyiben sikerülne *in vitro* termékenyítés nélkül a tenyészbikákat jó, közepes és gyenge *in vitro* fertilitású csoportba osztani egy egyszerű laboratóriumi módszerrel való vizsgálat segítségével, a gyakorlat számára végzendő embrió-előállítási folyamat lényegesen egyszerűsíthető lenne.

Kísérleteinkben egy fénymikroszkópos festési eljárás kiértékelésének megbízhatóságához a felúsztatási eljárás segítségével kísérleti bizonyítékot kívántunk találni a festés egyik kategóriájának csökkent mozgékonyságának igazolásával.

3.4.1. A felúsztatás hatásának elemzése automata motilitás elemző berendezéssel, a motilitási adatok összevetése az in vitro termékenyítés eredményeivel

3.4.1.1. Célkitűzés

Kísérleteinkben tenyészbikák termékenyítőanyagát jellemezve vizsgálni kívántuk, hogy a felúsztatási teszt milyen változást okoz a termékenyítőanyag motilitási paramétereiben, amit automata motilitásmérő berendezés segítségével határoztunk meg. A felúsztatási eljárást követően a mintákkal *in vitro* termékenyítettünk *in vitro* érlelt petesejteket. Az embriótenyésztés második napján, az osztódási % alapján felállított bikák közötti fertilitási rangsort összevetettük a felúsztatási teszt motilitás elemzéséből származó rangsorral. Feltételeztük, hogy amennyiben a motilitási értékek jól előrejelzik a termékenyítőanyag *in vitro* termékenyítőképességét, lehetőség nyílik arra, hogy az *in vitro* legjobban termékenyítő bikákat az embrió-előállító programok számára egyszerű motilitás meghatározás segítségével válasszuk ki.

3.4.1.2. Anyag és módszer

A kísérletekben hat holstein fríz tenyészbikától származó termékenyítőanyag mintát jellemeztünk (5. táblázat).

Bika neve, kp. lajstromszáma	Születési éve	Apa/ anyai nagyapa
Decima Threat – Red, 9788	1984.04.11.	05510 Hannover – Hill Triple Threat/ 0987 Topas
Fantom Rob-Red, 10661	1985.11.15.	06388 Grassiedale Rob Red/ 06190 Rostraver Farms Mister-Red
Futár Jason, 11047	1987.03.03.	096560 Twin-Lawn Elevation Jason/ 07195 Long-Haven Standout Stacy
Géza Tony, 11173	1987.05.15.	08376 Marshfield Elevation Tony/ 03543 Vivát - Fia
Heves Stewart, 11528	1988.04.04.	09610Crescentmead Chief Stewart/ 05085 Willow – Farm Rockman Ivanhoe
Laguna Future, 12875	1992.04.12.	11860 Zieland Fast Future/ 09610 Crescentmead Chief Steward

5. táblázat: A vizsgált bikák adatai

Felúsztatási teszt

A minták felolvasztást és a minta alárétegzését követő egy órás inkubáció után a felülúszóból 850 µl Sperm-TALP médiumot távolítottunk el, és 250 g-n centrifugáltuk (1998-as laboratóriumi protokoll alapján). A centrifugálást követően a csapadékról 650 µl folyadékot távolítottunk el, és hímivarsejteket 200 µl Sperm-TALP oldatban oldottuk fel.

Motilitás mérés

A méréshez az OMT Rt. Tulajdonában levő „HTM Motility Analyzer”, automata motilitás mérőberendezést használtuk fel.

A termékenyítő anyagból a felúsztatási eljárás előtt és után mintát vettünk, tárgylemezre cseppentettük, és azt a berendezés mérőnyílásába helyeztük. A mérőberendezés képfeldolgozó program segítségével a mért optikai felületen a hímivarsejtek elmozdulását egyedileg beazonosíthatóan érzékeli. A lemért spermiumokat 100%-nak véve megállapítja az összes motilis sejt (sum motility - SMOT), és az álló sejtek (static sperm - STAT) arányát. A motilis sejteket a mozgási sebesség alapján két kategóriába sorolja:

- Nagy motilitású hímivarsejtek (sperm of high motility - HMOT, $v > 50 \mu\text{s/s}$)
- Alacsony motilitású hímivarsejtek (sperm of low motility - LMOT, $v < 50 \mu\text{s/s}$)

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.

In vitro termékenyítés

A petesejtekhez adott termékenyítőanyag koncentrációja 10000 spermium/petesejt volt. A petesejteteket (átl. 30 petesejt/400 µl IVF-TALP) 22 órán keresztül termékenyítettük IVF-TALP médiumban. Az eredményeket befolyásolható esetleges spontán partenogenetikus osztódás megfigyelése céljából nem termékenyített, érlelt petesejtekből kialakított csoportokat is továbbtenyésztettünk.

In vitro embriótenyésztés

Az osztódó zigótákról 200 µm szájnnyílású üvegkapillárison történő többszöri felszívás és kifújás segítségével távolítottuk el a kumuluszsejteket. A tenyésztőmédiumnak

TCM 199 + 10% FCS oldatot használtunk fel (1998-as laboratóriumi protokoll alapján). A kísérleteket három ismétlésben végeztük.

3.4.1.3. Eredmények

A felúsztatási eljárást követően a felülúszóból származó hímivarsejtek motilitása kimutatható változást mutatott: 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 esetén emelkedett. A egyenes előrehaladással mozgó sejtek aránya nem növekedett jelentősen (STRT) (6. táblázat).

Bikák	Δ HMOT (%)	Δ LMOT (%)	Δ SMOT (%)	Δ STAT (%)	Δ STRT (%)	Δ VEL (μ m/s)
Decima	33	-21	13	-13	3	18
Fantom	26	-7	19	-19	2	8
Futár	31	-17	14	-14	-3	25
Géza	22	-16	6	-6	3	25
Heves	19	12	31	-31	11	8
Laguna	49	-18	31	-31	6	34
Átlag	32	-11	19	-19	4	20

6. táblázat: A felúsztatás motilitási paraméterekben okozott javító hatása

Az *in vitro* fertilitást jellemző osztódási arányokat és legjelentősebb változást mutató motilitási adatokat a 7. táblázat foglalja össze.

Bikák	álló sejtek %-os aránya ($\pm$ SD)	mozgó sejtek %-os aránya $\pm$ SD		osztódási %
		HMOT	LMOT	
Decima	12 ($\pm$ 1) ^a	55 ($\pm$ 7) ^a	33 ($\pm$ 4) ^a	73 ($\pm$ 3) ^a
Fantom	9 ($\pm$ 2) ^a	48 ($\pm$ 2) ^a	43 ($\pm$ 0) ^a	81 ($\pm$ 5) ^{ab}
Futár	10 ($\pm$ 3) ^a	54 ($\pm$ 6) ^a	36 ($\pm$ 4) ^a	49 ($\pm$ 4) ^c
Géza	12 ($\pm$ 5) ^a	38 ($\pm$ 8) ^{ab}	51 ($\pm$ 8) ^{ab}	53 ($\pm$ 6) ^c
Heves	6 ($\pm$ 1) ^a	35 ($\pm$ 6) ^b	59 ($\pm$ 6) ^b	91 ($\pm$ 4) ^b
Laguna	3 ($\pm$ 1) ^b	63 ($\pm$ 3) ^a	34 ($\pm$ 3) ^a	77 ($\pm$ 4) ^a
Partenogenetikus	-	-	-	0

7. táblázat: A termékenyítőanyag felúsztatást követő motilitási- és a termékenyített petesejtek osztódási adatai. Statisztikai próba: χ^2 a.,b.,c.: szignifikáns eltérés az oszlopokon belül ($P < 0,05$)

3.4.1.4. Következtetések, javaslatok

A felúsztatási eljárás minden bika esetében növelte (+6-31%) a motilis sejtek arányát (Δ SMOT %) és a motilitási értékek is minden esetben javultak. Eredményeink alátámasztják a PARRISH és munkatársai által 1984-ben leírt felúsztatási technika motilitás irányú szelekciós hatását, mérési eredményeink szerint is a kezelést követően a felülúszóban a bizonyíthatóan jobb képességű hímivarsejtek találhatók meg. Az előkezelt termékenyítőanyag használatával, meghatározott spermiumsűrűség mellett, így a termékenyülés esélye jelentősen megnövekedhet.

A felúsztatási eljárást követően a bikák között a HMOT és LMOT motilitási értékekben tapasztaltunk statisztikailag is igazolható különbségeket. Géza és Heves bikák mintáinak felülúszója a többi bika spermájánál gyengébb motilitásúnak bizonyult, ezért feltételeztük, hogy ennél a két bikánál az *in vitro* termékenyítés során is gyengébb termékenyítési adatokat figyelhetünk meg. Géza esetében ez a feltételezés helyesnek is bizonyult, azonban meglepetésünkre a motilitási adatok alapján leggyengébbnek feltételezett Heves bika termékenyítőanyagával termékenyített petesejtek osztódtak a legnagyobb arányban. Az embriófejlődés során spontán szűznemzést nem tudtunk megfigyelni.

Az eredményeket összefoglalva, összhangban PARRISH és mtsai 1986-ban tett megfigyelésével, sikerült kimutatnunk, hogy a felúsztatási eljárás a termékenyítőanyag motilitás alapján való szelekcióval javítja a termékenyítő anyag minőségét. Az embriótenyésztés osztódási eredményei szerint az *in vitro* termékenyítőképeséget azonban nem kizárólag a hímivarsejtek mozgékonyága határozza meg. Megállapíthatjuk, hogy az *in vitro* embrió-előállító programok számára alkalmas termékenyítőanyag megválasztását csak a motilitási paraméterekre nem alapozhatjuk, a teszt termékenyítések elhagyása nem indokolt (BODÓ és mtsai, 1998a).

Laboratóriumunkban a leírt kísérletek óta végzett további kísérletek eredményeként a felülúsztatás alatt a felúszó hímivarsejtek koncentrációjának időbeli változását tanulmányozva megállapítottuk, hogy 60 perc helyett elegendő csupán 30 percig végezni a felúsztatási eljárást, mert a felülúszóban a hímivarsejtek koncentrációja a maximum pont elérését követően lecsökken. A felolvasztás utáni, bikák közötti különbséget a felúsztatási eljárás, a felülúszóban található termékenyítőanyag minőségének kiegyenlítésével

csökkenti, azonban a felülúszó spermium sűrűsége bikánként változó. Jelenleg kísérleteket folytatunk a felúsztatási eljárás során kialakított felülúszó hímivarsejt koncentrációja, és az egyszerű spermiummosást követő *in vitro* fertilizáció eredményeinek összehasonlítása céljából, feltételezve, hogy a termékenyítőanyag felúszási erélye összhangban állhat az *in vitro* termékenyítőképesseggel (NÁNÁSSY és mtsai, 2003).

3.4.2. A felúsztatás hatásának elemzése Kovács-Foote féle festéssel, a festési eredmények összevetése az *in vitro* termékenyítés eredményeivel

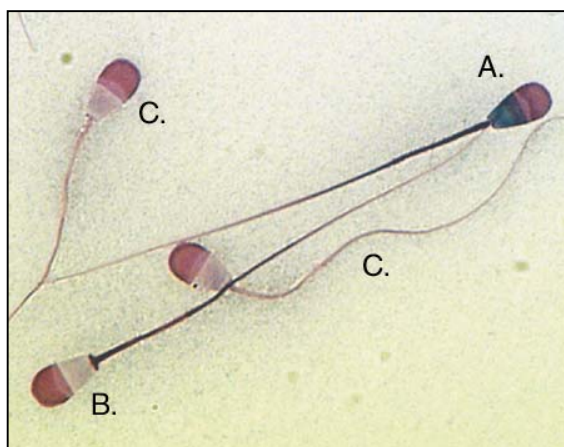
3.4.2.1. Célkitűzések

Számítógép segítette termékenyítő anyagvizsgálat eszközeként a gyakorlatban általában csak a drága, de teljesen automatizált elemzést lehetővé tevő CASA berendezéseket (pl. HTM Motility Analyser) és a készített digitalizált képeket elemző programokat (pl. MEDEALAB - Tracking System, Bildanalyse) alkalmazzák élő minta értékeléséhez. Ezek a komplex eszközök azonban nem fixált és festett kenetek értékelésére lettek létrehozva. Mivel laboratóriumunkban a termékenyítőanyag rutinjellegű morfológiai vizsgálatához a Kovács-Foote féle tripán kék/Giemsza festést (KOVÁCS és FOOTE, 1992) használjuk fel, a festés kiértékelésének egyszerűsítése céljára egy, mind a rutin gyakorlatban, mind kísérletek során is alkalmazható hímivarsejt számláló adatbeviteli program kifejlesztését tűztük ki célul (BODÓ és mtsai, 2002b). A termékenyítőanyag minősítést végző laboratóriumok zöme rendelkezik IBM kompatibilis személyi számítógéppel, így kézenfekvő volt, hogy a szoftver segítségével a laboratórium számítógépét alakítsuk adatbeviteli eszközzé. A programot a kutatás és az oktatás számára ingyenessé kívántuk tenni, ezért azt az Interneten bárki számára letölthető formában helyeztük el.

Ezt a programot is felhasználó kísérleteinkben a felúsztatási eljárásnak a festési eredményekben kifejeződő hatását vizsgáltuk, kilenc holstein-fríz bika termékenyítőanyagát jellemezve. A felúsztatási eljárást követően a mintákkal *in vitro* érlelt petesejteket termékenyítettünk *in vitro*. Az embriótenyésztés második napján, az osztódási % alapján felállított bikák közötti fertilitási rangsort vetettük össze a felúsztatási teszt

során, a festési eredmények alapján kialakított rangsorral. Feltételeztük, hogy a festési eredmények előjelezhetik a termékenyítőanyag *in vitro* termékenyítőképességét.

Az akroszóma állapotát az akroszómális régió Giemsa festődése, és a sejtek élő/holt állapotát, a posztaktroszómális régió tripán kék festődése alapján egyszerre kimutató, Kovács-Foote féle festés kiértékelésekor NAGY és munkatársai 1999-ben felfigyeltek arra, hogy egyes, élő festődést mutató, ép akroszómájú sejtek farki része (középdarab, vagy a fark teljes hosszában) szintén festődést mutat (25. ábra).



25. ábra: Halott (A.), élő, ép akroszómájú, de festődő farkú (B.), élő, ép akroszómájú (C.) hímivarsejtek

A festés eredményei szerint, az élő hímivarsejtek akroszómája lehet ép (ÉE), 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) (8. táblázat).

Élő sejtek		Holt sejtek	
Kategória	Akroszóma állapota	Kategória	Akroszóma állapota
ÉE	ép	HÉ	ép
ÉF	ép	HS	sérült, fellazult
ÉS	sérült, fellazult	HN	hiányzik
ÉN	hiányzik		

8. táblázat: A Kovács-Foote festés eredmény kategóriái

Feltételezhető volt, hogy a membrán sérülés a mozgékonyág elvesztését okozza. Ennek igazolásához a felúsztatási tesztet hívtuk segítségül, mivel annak a motilitás szempontjából végzett szelekciós hatásáról előzőleg már meggyőződünk (BODÓ és mtsai, 1998). Feltevésünk szerint, ha a farok festődés valóban a korlátozott motilitásra utal, a felúsztatási eljárás végén a felülúszóban található élő sejtek között az élőként festődő, de farok sérült sejtek aránya kisebb lesz, mint a felolvasztás után vett mintában, s így közvetve igazolhatjuk a kérdéses (ÉF) festési frakcióba tartozó sejtek csökkent motilitását.

3.4.2.2. Anyag és módszer

A vizsgálatokhoz tíz tenyészbika (Lantos, Lidérc, Lobogó, Kiváló, Kristály, Tabló, Talizmán, Trenk, Szeged és Szótlán) mélyhűtött termékenyítőanyagát használtuk fel.

A termékenyítőanyag minta festése

A műszalmák felolvasztása után közvetlenül mintát vettünk, és a Kovács-Foote féle festéshez elkészítettük a keneteket. A felülúsztatást a laborprotokoll szerint végeztük. A felülúszóból, majd a centrifugálás után a 100 µl-ben visszaoldott koncentrátumból szintén kenetet készítettünk, és a tárgylemezeket megfestettük.

A festés során 10 µl-nyi mintát tárgylemezre cseppentett, 0.4% tripán kék (Sigma T 8154) festékkoldat fiziológiás sóoldattal való 1:1 arányú hígításával előállított 0.2%-os tripán kék oldatban oldunk fel, majd egy másik tárgylemez segítségével azonnal kenetet készítünk, amelyet függőleges helyzetben szobahőmérsékleten légszárítunk. A beszáradást követően a lemezeket 0.2 g neutrál vöröst tartalmazó (Sigma N 2880), 86 ml 1 N HCl-ből és 14 ml 37% formaldehidből álló fixáló oldatba helyezzük két percig. A fixálás után csapvízzel, majd desztillált vízzel átöblítjük, és 7.5% Giemsa festékben (Sigma GS 500) festjük legalább négy órán át a lemezeket. A festés után a mintákat csapvízzel történő leöblítés után két percig desztillált vízben differenciáltatjuk, majd levegőn megszárítjuk. A tárgylemezekre DPX-szet (BDH) cseppentve fedőlemezzel fedjük. A festést fénymikroszkóppal bíráljuk el, 40 x, vagy immerziós, 100 x objektív használatával.

A laboratóriumban kifejlesztett Hamupipőke/Cinderella sejtszámláló programmal végzett számlálás során a keneten rögzített, és megfestett sejteket (200 db/lemez) a festés hét kategóriájába soroltuk.

In vitro termékenyítés és embriótenyésztés

A felúsztatást követően az előkezelt termékenyítőanyag mintákkal *in vitro* teszttermékenyítéseket végeztünk. A vágóhídról származó petefészekből kinyert, egy napig érlelt petesejteket, felúsztatási kezelést követően, $1 \cdot 10^6$ spermium/ml koncentrációban, 22 órán keresztül $20 \mu\text{g/ml}$ heparinnal kiegészített IVF-TALP médiumban, 39°C -on, 5% CO_2 -ben termékenyítettük. A termékenyítést követően a petesejteket körülvevő kumuluszsejteket másfél perces vortexeléssel eltávolítottuk, majd TCM 199 + 10%FCS tenyésztőfolyadékban tenyésztettük tovább (1998-as laboratóriumi protokoll alapján). A harmadik napon megállapítottuk az osztódási arányt.

3.4.2.3. Eredmények

Hamupipőke/Cinderella sejtszámláló program

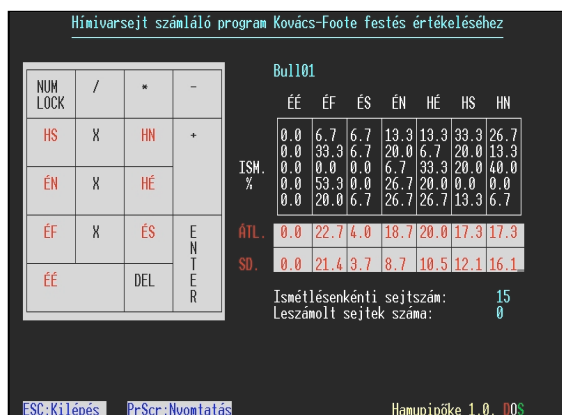
Az IBM kompatibilis számítógépek számára kifejlesztett program a mikroszkóp mellé helyezett számítógép billentyűzetének NumPad – számkarakter input egységének billentyűihez rendeli a festés különböző kategóriáit, így a számlálást végző operátor a megfelelő billentyű lenyomásával tárolhatja el a megfigyelt sejtek festési adatait (26. ábra), amit a számítógép hangjelzéssel jelez vissza számára (minden kategóriához külön hang tartozik).



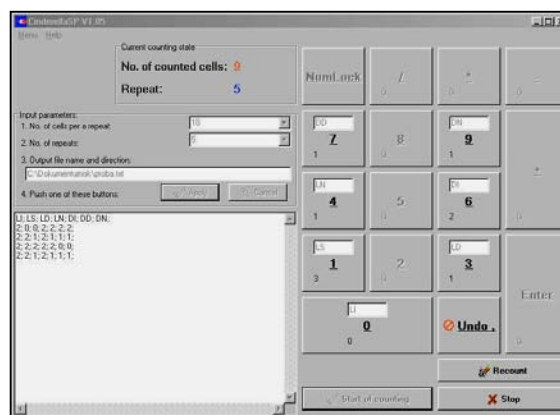
26. ábra: A program használat közben

Az előre beállított sejtszám leszámlálásának befejezéséről a program szintén hangszignállal tájékoztatja a számlálást végző személyt. Több számlálási ciklus, ismétlések is elvégezhető

egy futtatás alkalmával. A számlálás aktuális állása a számítógép monitorján folyamatosan követhető. A program DOS változata (27. ábra) akár kisteljesítményű, tíz éves számítógépeken is futtatható, az eredményeket a képernyőn egy eredménytáblázatban összesíti, átlagolja, valamint kiszámítja a szórásértékeket. A Windows operációs rendszere készült változatba (28. ábra) ezt az elemzési lehetőséget nem építettük bele, feltételezve, hogy a felhasználók rendelkeznek táblázatkezelő programmal (pl. Microsoft Excel), amivel a számítások könnyen elvégezhetők. Mindkét program az eredményeket az Excel számára, a szükséges fájlkonverziós beállítások segítségével könnyen importálható, txt kiterjesztésű eredményfájlba menti ki. A programokhoz készített használati útmutató tájékoztat a programok kezeléséről, az adatok betáplálási és mentési eljárásáról valamint ismerteti a Kovács-Foote festés lépéseit.



27. ábra: DOS verzió (screenshot)



28. ábra: Windows verzió (screenshot)



29. ábra: A program letöltési oldala (screenshot)

Mindkét program angol és magyarnyelvű változatát elkészítettük. A programok az Internetről, a <http://sperm.abc.hu> információs web-site-ről ingyenesen letölthetők (29. ábra).

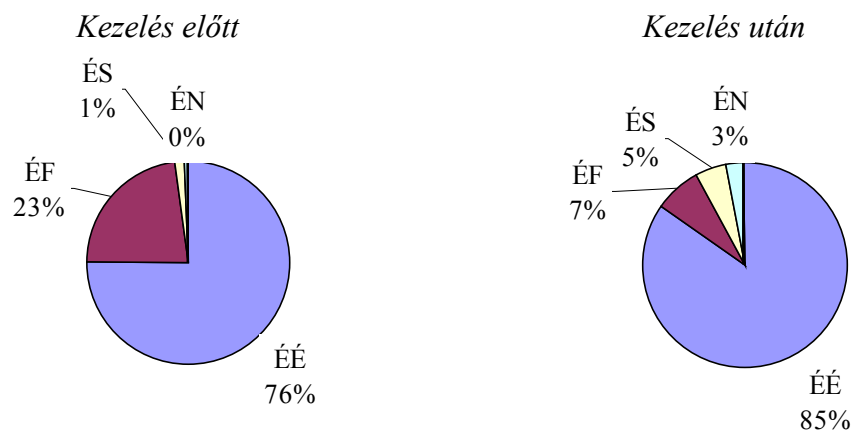
A festés eredményei

A Kristály nevű bika műszalmáiból származó mintákban a kiindulási állapotban túlnyomórészt csak halott sejtek találtunk, ami miatt kizártuk a kísérletből.

A lemezek kiértékelése alapján kapott a bikák átlagolt eredményeit (mintánként három ismételtsben végzett számlálás, 200 spermium/ciklus) a 9. táblázat foglalja össze.

Festési kategóriák	A spermafrakciók %-os aránya (Átlag $\pm$ SD)		
	Felúsztatás előtt	Felülúszó	Centrifugálás után
ÉE	53.1 $\pm$ 7.3 ^a	73.3 $\pm$ 6.6 ^b	65.1 $\pm$ 6.3 ^b
ÉF	16.3 $\pm$ 3.7 ^a	6.3 $\pm$ 2.2 ^b	8.8 $\pm$ 2.4 ^b
ÉS	1.0 $\pm$ 0.5	4.5 $\pm$ 2.9	2.8 $\pm$ 0.9
ÉN	0.3 $\pm$ 0.3	2.3 $\pm$ 1.9	5.4 $\pm$ 4.7
HÉ	1.2 $\pm$ 1.0	1.2 $\pm$ 1.0	1.6 $\pm$ 1.3
HS	25.0 $\pm$ 4.9 ^a	9.2 $\pm$ 2.5 ^b	10.6 $\pm$ 3.2 ^b
HN	3.1 $\pm$ 1.1	3.3 $\pm$ 2.0	5.7 $\pm$ 3.9

9. táblázat: A Kovács-Foote festés eredményei a kezelés előtt és után. *Statistikai próba: χ^2 a., b., c.: sorokon belüli szignifikáns különbség található az értékek között ($P < 0.05$)*



30. ábra: A felúsztatás hatása az élő sejtek közötti arányokra (Összes élő sejt = 100%)

A felülúszóban az élő, ép akroszómájú sejtek (ÉE) aránya a kezelés hatására statisztikailag igazolhatóan nőtt a felúsztatási eljárás hatására, miközben az elvárásainknak megfelelően a festődő farkú frakció (ÉF) mérete szignifikánsan lecsökkent (30. ábra).

Az egyes bikák élő, ép akroszómájú sejtek alkotta frakciójának a kezelés hatására bekövetkező arányváltozását a 10. táblázat szemlélteti.

bikák	% Swim up előtt Felülúszó Centrifugálás után		
Kiváló	55,8	74,5	72,1
Lantos	44	75,4	72,3
Lidérc	46	70	70
Lobogó	52,5	74	64,2
Szótlan	57,3	57,5	52,8
Tabló	49,3	80,5	67,3
Talizmán	51,3	77	61,5
Trenk	68,8	76,8	61,3

10. táblázat: Az élő, ép akroszómájú sejtek arányának változása bikánként

A kezelés hatására a Szótlan és Trenk nevű bikákon kívül minden bika esetén 20-30%-kal nőtt a frakció aránya. A Szótlan bika mintája a kezelés ellenére jelentősen elmarad a bikák átlagos frakció arányától felúsztatási eljárás végén. A centrifugálás minden esetben károsan hatott az élő, ép akroszómájú sejtekre. Az akroszóma nélküli sejtek aránya megemelkedett, miközben a sérült, fellazult akroszómájú sejtek mennyisége csökkent. A halott, akroszóma nélküli sejtek mennyisége enyhén nőtt.

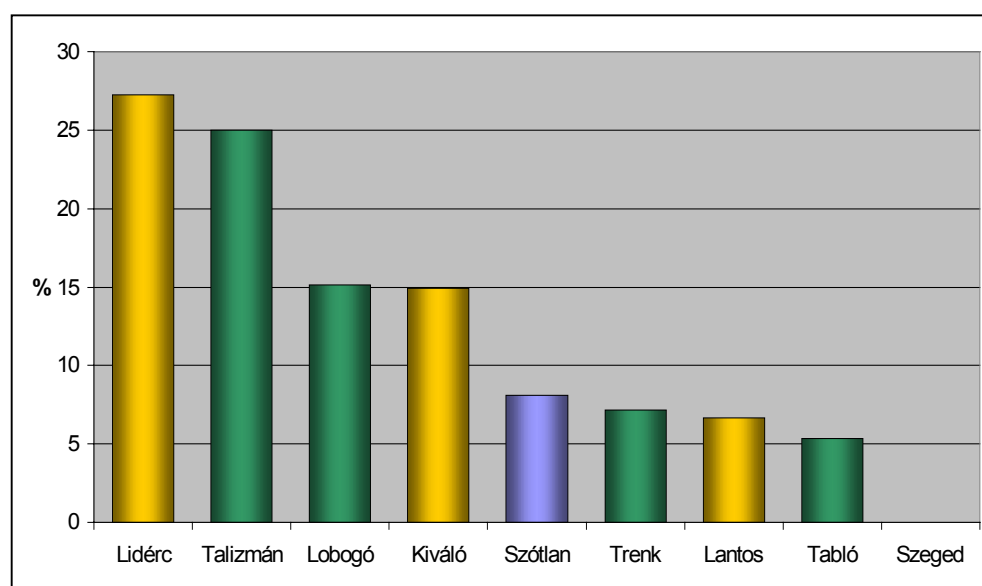
	ÉE >70%	ÉE 60-70%	ÉE 50-60%	ÉE 40-50%	ÉE <40%
Kezelés előtt		<i>Trenk</i>	Kiváló Lobogó <i>Szótlan</i> Talizmán	Lantos Lidérc Tabló	<i>Szeged</i>
Kezelés után	Kiváló Lantos Lidérc	Lobogó Tabló Talizmán <i>Trenk</i>	<i>Szótlan</i>		<i>Szeged</i>

11. táblázat: A kezelés hatása bikánként

A bikák felúsztatási eljárás előtti és a kezelés utáni, az élő, ép akroszómájú sejtek aránya alapján kialakított rangsorának változását a 11. táblázat tartalmazza. A felúsztatási eljárást követően a bikák rangsora átrendeződik. Három bikánál (dőlt betűvel jelölve) nem tapasztaltuk a felúsztatás lényeges javító hatását.

Az in vitro termékenyítés eredménye

A bikák termékenyítőanyagának *in vitro* termékenyítő képességét a petesejtek osztódási %-a alapján határoztuk meg (31. ábra).



31. ábra: A bikák között az osztódási % alapján felállítható rangsor *(Az azonos színű oszlopok a felúsztatási eljárás utáni festési eredmények alapján hasonló minőségű termékenyítő anyaggal rendelkező bikákat jelölik.)*

Az osztódási eredmények alapján a Lidérc és a Talizmán nevű bikák *in vitro* fertilitása volt a legjobb, Kiváló és Lobogó gyengén termékenyített, míg Szóttlan, Lantos, Trenk, és Tabló bikák termékenyítőanyagával termékenyített petesejtek több mint 90%-a nem osztódott. A Szeged nevű bika *in vitro* egyáltalán nem termékenyített

3.4.2.3. Következtetések, javaslatok

A felúsztatási teszt segítségével közvetve sikerült igazolnunk, hogy a NAGY és munkatársai által megfigyelt élő, ép akroszómájú és festődő farkú sejtek valóban gyengébb motilitásúak, mert a motilis sejteket koncentrálására szolgáló spermiumszelekciós módszerrel a kérdéses sejtek arányát a felülúszóban jelentősen csökkenteni lehetett.

Az eredmények alapján kijelenthetjük, hogy a Kovács-Foote festés a sejtek élő/holt állapotának, az akroszóma épségének kimutatása mellett bizonyíthatóan ismereteket nyújt a sejtek mozgékonyaságáról is (BODÓ és mtsai, 2000a, BODÓ és mtsai, 2000b).

A felúsztatási eljárás leglátványosabban a Lidérc nevű bika esetén javította a termékenyítőanyag minőségét. Ez a termékenyítőanyag termékenyített *in vitro* is a leghatékonyabban. Bár a felúsztatási eljárást követően, a felülúszó 70 % felett tartalmazott mozgékony ép akroszómájú ivarsejteket a Lantos nevű bika esetén a festés alapján, az *in vitro* termékenyítés során ugyanaz a termékenyítőanyag csak igen gyenge osztódási %-ot tudott elérni. Szótlán, Trenk és Szeged bikák esetén a termékenyítési adatok megfeleltek a felúsztatási eljárás eredmények alapján való elvárásnak.

A felúsztatási tesztet követő, festési eredmények alapján felállított bikák közötti rangsor csak részben felelt meg a termékenyítés során az *in vitro* termékenyítőképességet jelző osztódási % alapján felállított rangsornak, ezért megállapíthatjuk, hogy a Kovács-Foote festés, akárcsak a motilitási paraméterek meghatározása, önmagában nem alkalmas eljárás az *in vitro* termékenyítőképesség előrejelzésére (BODÓ, 2000c).

3.5. Összefoglalás

A mezőgazdasági Biotechnológiai Kutatóközpont Embriológiai Laboratóriumában kidolgoztunk egy olyan *in vitro* embrió-előállítási protokollt, amit különböző felhasználási területeken egyaránt sikeresen lehet alkalmazni. A tenyésztőművelési médiumok hatékonyságának összehasonlítása alapján kiválasztott SOFaaci + 5% FCS tenyésztőművelési médium segítségével a termékenyített petesejtek 20-30 %-a fejlődik laboratóriumunkban hólyagcsírává.

Rendszerünk alkalmas az **alapkutatás számára** kísérleti objektumként embriók előállítására, de a **gyakorlat számára** képes nagy tenyésztéssel bíró petesejt donor állatoktól származó petesejtek célpárosítással való *in vitro* termékenyítésével nagy értékű embriók létrehozására is. A származást végig nyomon követve, donoronként elkülönítve, a kis csoportokban tenyésztett embriók kereskedelmi célból kialakított embrióbankban tárolhatók mélyhűtve, de alkalmasak recipiens nőtényekbe való közvetlen beültetésre is.

Rendszerünket **génmegőrzési programokban** is felhasználhatjuk, *ex situ* génmegőrzést szolgáló embrióbank számára állíthat elő embriókat *in vitro*.

Az *in vitro* embrió-előállító rendszer alkalmas tenyészbikák **termékenyítő-anyagának funkcionális elemzésére** is. Kísérleteinkben egyelőre nem sikerült olyan egyszerű vizsgálati módszert találnunk, ami alkalmas lenne egy termékenyítőanyag minta *in vitro* termékenyítőképességének előrejelzésére, ezért egy erre alkalmas prediktív eljárás kidolgozásán jelenleg is dolgozunk.

A termékenyítőanyag értékelés során a gyakorlatban használt Kovács-Foote féle festés kiértékelésének megkönnyítése érdekében kifejlesztettünk egy Internetről ingyenesen letölthető **számítógépes programot** (DOS, Windows verzió), ami alkalmassá teszi a laboratórium számítógépét folyamatos mikroszkópos megfigyelés mellett végezhető adatbevitelre, megkönnyítve ezzel a hímivarsejtek festési kategóriák szerinti leszámlálását. A program a hímivarsejteket mikroszkóppal kiértékelő személy munkáját segíti.

Az *in vitro* termékenyítés felúsztatási eljárását felhasználva sikerült közvetve igazolnunk, hogy a Kovács-Foote festést alkalmazva **a farok festődést mutató**, de egyébként **élőként festődő, ép akroszómájú hímivarsejtek csökkent mozgásképességűek**, ezért a festési eredmények kiértékelésekor a termékenyítésre alkalmas élő sejtek közül ezt a frakciót ki kell zárni.

Az *in vitro* előállított embriókat a recipiens állatokba való ültetés előtt genetikailag jellemezhetjük. Az ehhez szükséges módszerekkel, a genetikai vizsgálathoz szükséges sejtmintha kinyeréséhez kidolgozott eljárásokkal foglalkozik a dolgozat következő része.

4. A PREIMPLANTÁCIÓS GENETIKAI DIAGNÓZIS ALKALMAZÁSÁNAK LEHETŐSÉGE A SZARVASMARHATENYÉSZTÉSBEN

4.1. Irodalmi áttekintés

4.1.1. Bevezetés

Európában a kereskedelmi céllal recipiens állatokba ültetett embriók 90%-át MOET programokban állítják elő. Az embriók egy része, 1997-ben 6%, 1998-ban 10%, nagy tenyészértékű szülőktől, *in vitro* embrió-előállításból származik (HEYMAN, 1999). Ha az embriókat már beültetésüket megelőzően, az un. preimplantációs fejlődési szakaszban, genetikailag lehet jellemezni, értékük jelentősen növelhető. A genetikai jellemzés az embriók genetikai anyagának vizsgálatán alapszik, ami az embriók egyediségén alapuló szelekciós lehetőséggel segítheti az állattenyésztő munkáját.

A korai embriófejlődés szakaszában, az emlős embriók mikromanipulációval történő darabolása (felezés, negyedelés) után az embriódarabok képesek regenerálódni. Belőlük a beültetést követően életképes magzat és utód fejlődik (OZIL és mtsai, 1982). Ezen megfigyelések alapján dolgozták ki a szarvasmarha embriók (morulák, blasztociszták) felezési technológiáját (embryo slicing, embryo bisecting), amely az identikus ikrek létrehozásának, a klónozásnak az első sikeres technológiájává vált (WILLADSEN, 1979; WILLADSEN és POLGE, 1981). A kompaktálódást megelőző embriófejlődési szakaszban (4-16 sejtes embriók) néhány embrionális sejt, un. blasztomer mikromanipulációval való eltávolítása sem befolyásolja jelentősen az embriófejlődést (WILTON és TROUNSON, 1989). Megfigyelések szerint a beavatkozás után megmaradó sejtek totipotenciájuknál fogva képesek pótolni az eltávolított sejteket, átvállalva szerepüket. Az eltávolított sejtek felhasználhatók genetikai elemzésre, így az embrió, még a beágyazódást megelőzően genetikailag jellemezhető.

A preimplantációs genetikai diagnózist eredetileg az embergyógyászat számára, az asszisztált reprodukciós terápia kiegészítéséhez fejlesztették ki. A prenatális diagnosztikai eljárás segítségével örökletes terheltségeket hordozó, *in vitro* fertilizációs programban résztvevő pároknak egészséges, az örökletes terheltségtől teljesen mentes, vagy a mutáns

gént csak recesszív formában hordozó, heterozigóta, de egészséges fenotípusú gyermeke születhet. A beavatkozás a terheltégben szenvedő, beteg gyermekek megszületésének kockázatát nagymértékben csökkenti.

A kilencvenes évek elejétől a modern molekuláris biológia intenzíven fejlődik. Az új diagnosztikai módszerek és a kutatás előrehaladása lehetővé tette olyan betegségek szűrését, mint többek között a Duchenne muskuláris disztrofia, a cisztikus fibrózis, hemofília A, Tay-Sach féle és a Huntington betegség. A legújabb eredmények szerint az amiloid prekursor fehérjét kódoló gén V717L mutációja okozta, korai kifejeződésű Alzheimer kór szűrése számára sikerült embrionális sejteken is működő genetikai tesztet kifejleszteni (VERLINSKY és mtsai, 2002).

Az állattenyésztésben a genetikai diagnózist, ellentétben a humán gyakorlattal, először nem terheltégek kimutatására, hanem az embrió-átültetést megelőzően, embriómosásból származó embriók ivarának meghatározására használták fel (HERR és mtsai, 1990)

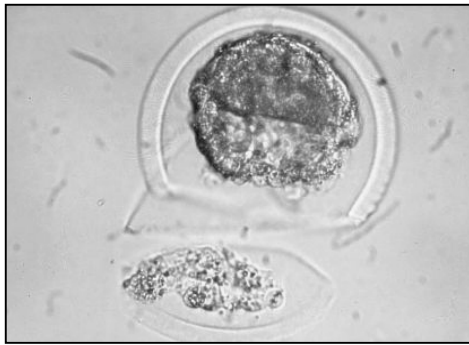
A preimplantációs genetikai diagnózis hatékonysága az embrionális sejtek kinyerési technikájának, az embrióbiopsziának és az eléggé érzékeny, sokszor egy sejt genetikai anyagát is vizsgálni képes genetikai analízisnek a sikerétől függ.

4.1.2. A preimplantációs genetikai diagnózis módszerei

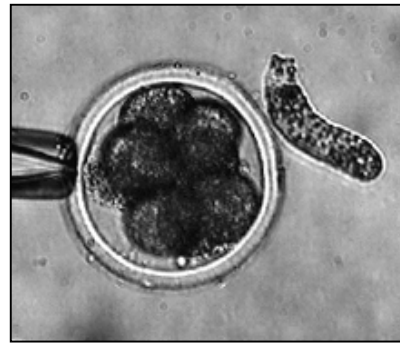
4.1.2.1. Embrióbiopszia

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 elmetészése után, a későbbi magzati méhlepényt képző, trofektoderma sejtek egy részét (az eredeti embrió térfogatának 10-30 %-át) lehet a hólyagsírákból eltávolítani. A mikromanipuláció során az embriócsomó, amiből később a magzat fejlődik, épen marad (32. ábra). Az embriócsomót tartalmazó embrió rész recipiens állatokba ültethető (BREDBACKA, 1998). A mikromanipulációt általában mikroszkópasztalra szerelt mikromanipulátorok segítségével hajtják végre. Elterjedőben van a szabad kézzel történő felezés is, ami a beruházási költségeket jelentősen mérsékeli (BREDBACKA és mtsai, 1995).

A **mikroaspirációs technikát** eredetileg egér blasztomerek kinyerésére dolgozta ki Wilton és Trounson 1989-ben. A 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 (33. ábra).



32. ábra: Embrióbiopszia darabolási technikával



33. ábra: Embrióbiopszia mikroaspirációs technikával

A zona pellucida, ellentétben a darabolási technikával, ez esetben csak igen kis felületen sérül, így az embrió védelmében játszott funkcióját az embriófejlődés későbbi szakaszában is képes betölteni. A kompaktálódás folyamatát elősegíti, hogy az alig sérült peteburok megakadályozza a blasztomerek dezintegrációját, ami a peteburok nagyobb részének hiányában egér esetén négy, szarvasmarhánál még nyolc-sejtes korban is bekövetkezhet.

A darabolási technikával szemben ez esetben a mikromanipulált embriók a beavatkozást követően még három napig fejlődhetnek *in vitro*, ezért az embrióbeültetést megelőzően jóval hosszabb idő áll rendelkezésre a genetikai teszt elvégzésére.

Szarvasmarhánál a mikroaspirációt csak *in vitro* előállított embriókon indokolt végrehajtani, mert az embriómosással kinyert, későbbi fejlődési állapotú embriókat (morulákat és hólyagsírákat) már csak darabolással lehet biopsziázni. Ha az embriókat a mikroaspirációt követően mélyhűtik, a nagy felületen intakt zona pellucida krioprotektív hatása jobban érvényesülhet (VAJTA és mtsai, 1997). A módszer hátrányát az jelentheti hogy a kevés kinyert, 1-3 blasztomer legfeljebb sejtenként egy párban tartalmazza a genotipizálni kívánt géneket, és ez a téves diagnózis kockázatát megnöveli.

CARBONNEAU és munkatársai szerint (1997) az embriók *in vitro* továbbfejlődési képessége jelentősen csökkenhet a mikroaspirációt követően, és recipiens állatokba ültetésüket követően a vemhesülési arány is kisebb, mint az intakt embriók beültetésekor.

4.1.2.2. A blasztomerek genetikai elemzése

Az analízis technikája párhuzamosan fejlődött a molekuláris biológiai módszerek tökéletesedésével.

Kariotipizálás

A legelőször alkalmazott genetikai vizsgálat az egyik embriófél sejtjei közül a mitózis metafázisában levők kromoszómafestése volt. Az analízis az ivari kromoszómák és kromoszóma rendellenességek kimutatására volt alkalmas (ANDERSON, 1985; PICARD és mtsai, 1985). Az első szexált embrióból származó borjú 1985-ben született meg (PICARD és mtsai, 1985). A meglehetősen nehézkes, bizonytalan eljárás alkalmazása mellett (SEIKE és mtsai, 1990; YADAV és mtsai, 1990), a nyolcvanas években HY-specifikus monoklonális antitest tesztet is kifejlesztettek az embriók ivarának immunreakcióval történő kimutatásához (ANDERSON, 1987; WACHTEL és mtsai, 1988).

Polymerase Chain Reaction (PCR)

Az 1987-ben leírt rendkívül érzékeny analitikai módszer egy ismert szekvencia részletű DNS szakasz enzimatisz amplifikációján alapszik. Az adott célszekvencia, specifikus indító oligonukleotid szekvenciák segítségével, több ciklusban történő repetitív megsokszorozásával állítható elő a kimutatáshoz szükséges DNS mennyiség (MULLIS és FALOONA, 1987). A kinyert néhány embrionális sejt genetikai anyagának feltárása után alig néhány órával már megszülethet a vizsgálat eredménye. Az amplifikátumot gélelektroforézissel vagy magában a PCR csőben, DNS festékekkel lehet kimutatni (BREDBACKA és mtsai, 1995).

A módszer érzékenysége miatt akár egyetlen sejt egyetlen gén kópiája is kimutatható (egy-sejt PCR). A klinikai gyakorlat mutációk és szekvenciapolimorfizmusok kimutatására azonnal elkezdte felhasználni az eljárást (WONG és mtsai, 1987; VOSBERG, 1989). Az egy-sejt PCR technikát sikeresen alkalmazták ember (HANDYSIDE és mtsai, 1989) és

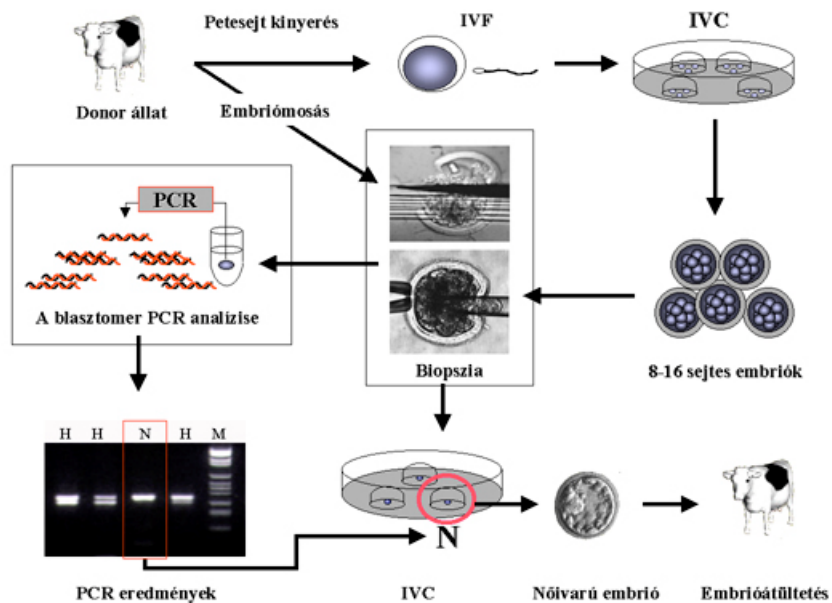
egér embrionális sejteken (BRADBURY és mtsai, 1990). Az első, PCR alapján való embriószexálási programból származó borjú megszületéséről HERR és munkatársai tudósítottak 1990-ben. Hamarosan megjelentek az embriószexáláshoz a gyakorlat számára is megbízhatóan alkalmazható PCR technikákat leíró közlemények (COTINOT és mtsai, 1991; PEURA és mtsai, 1991; BREDBACKA és mtsai, 1995). Magyarországon 1993-ban MACHÁTY és munkatársai közölték saját embriószexálási eljárásukat.

Fluoreszcens In Situ Hibridáció (FISH)

A technika szintén alkalmas egy specifikus szekvencia egy sejtből történő kimutatására. Előnye, hogy a fluoreszcens jelölés segítségével a vizuálisan is - *in situ* - értékelhető az eredmény. A célszekvenciához hibridizáló DNS próba vagy fluoreszcens festékekkel jelölt, vagy antigént kapcsoltak hozzá, amihez fluoreszcens antitest tapad, hogy a kimutathatósági határig fokozza a fluoreszcens jel szintjét. A FISH segítségével kromoszóma mutációk is vizsgálhatók, kimutatható az aneuploidia, mozaikosság, triploidia, és a transzlokációk is. A FISH-t (PENKETH és mtsai, 1989) illetve a FISH PCR-rel való kombinációját (MUNNÉ és mtsai, 1994) sikerrel alkalmazták a humán asszisztált reprodukciós gyakorlatban. Az első gyermek 1992-ben született *in vitro* fertilizációval létrehozott és genetikai diagnózissal terheltségre szűrt embrióból (HANDYSIDE és mtsai, 1992).

A embriómosás és *in vitro* embrió-előállítás segítségével nyert szarvasmarha embriók gyakorlatban végezhető szexálásának lépéseit a 34. ábra mutatja be.

A genetikai vizsgálatok körét ki is lehet szélesíteni, mert az embrió ivarának meghatározásán kívül lehetőség van egyes nagyhatású gének genotipizálására, transzgénikus-állat előállítás esetén a transzgén integrációjának meghatározására, valamint a szarvasmarha örökletes terheltségeinek szűrésére is.



34. ábra: Az embriószexálás menete.

A tej ipari feldolgozhatósága szempontjából a kappa-kazein BB genotípus előnyös. A BB genotípus előfordulása aránylag ritka. Amennyiben a heterozigóta szülőktől létrehozott embrió kappa-kazein genotípusa még a beültetést megelőzően megállapítható, kereskedelmi értékesítéskor a BB genotípusú embrióért nagyobb ár kérhető. A preimplantációs szelekció segítségével egy generáció alatt BB kazein vonal alakítható ki (DOHY, 1999).

Transzgénikus állatok létrehozásakor költségkímélés miatt indokolt lehet a csak transzgént hordozó embriók beültetése. A transzgén mellett az embrió ivarát is meg lehet határozni, mert a transzgénikus vonal alapítás lényegesen olcsóbb és gyorsabb, ha az alapító hím ivarú (HORVAT és mtsai, 1993; HYTTINEN és mtsai, 1994; HYTTINEN és mtsai, 1996). A PCR-en alapuló genetikai vizsgálat megbízhatóságát azonban rontja, hogy a transzgén az embrióban mozaikosan épül be. Így, még ha a biopsziával kinyert blasztomer negatívnak is bizonyul a transzgén szempontjából, az embrióban lehetnek transzgénikus sejtek, de ennek a fordítottja is előfordulhat. A PCR analízist helyettesítheti, ha a génkonstrukcióval fluoreszcens protein markergént (pl. GFP) koinjektálnak. Kettős beépülés, és a marker gén preimplantációs korban történő expressziója esetén a

transzgénikus embriók a beültetést megelőzően, mikromanipuláció nélkül, fluoreszcens mikroszkóp segítségével kiválogathatók (CHAN és mtsai, 1999).

A szarvasmarha embriók mendeli öröklésmenetet mutató, örökletes terheltségekre való szűrése is indokolt lehet preimplantációs korban.

A sokáig látens módon rejtőzködő, majd hirtelen széleskörben jelentkező örökletes terheltségek terjedéséért a mesterséges termékenyítés gyakorlata tehető felelőssé. Ha egy recesszív formában megnyilvánuló terheltségre nem vizsgált, a terheltség tekintetében heterozigóta egészséges fenotípusú tenyészbika az ivadékteljesítmény vizsgálat alapján kiváló tenyészértékűnek bizonyul, a szaporítóanyag kereskedelemben nagy lesz iránta a kereslet. Az első néhány utódgenerációban a terheltség nem lesz kimutatható, ha a termékenyített nőivarú állatok mentesek a terheltségtől. Még ha heterozigóta terheltség hordozó is a termékenyített állat, csupán 25% az esélye, hogy utódán megfigyelhető a rendellenesség. Ha a mutáció embrionális, magzati korban letális hatású, észlelése rendkívül nehéz. Amikor az állomány nagy része heterozigótává válik, a terheltség hirtelen, szinte a semmiből bukkan elő. A tenyész bikák ismert terheltségekre való szűrése, és a diagnosztika fejlesztése ezért kiemelt fontosságú. A hordozónak bizonyuló bikákat, még ha tenyészértéke szerint igen értékes is volna, a tenyésztésből kizárják. A preimplantációs genetikai diagnózis egy lépéses rezisztencianemesítési eljárásként való alkalmazásával a tenyészbika genetikai értékét meg lehet menteni. Amennyiben ismert a vad típusú gén és a terheltségért felelős mutáció szekvenciája, kimutatására genetikai próbát lehet tervezni. A genetikai vizsgálat végrehajtható az embrióból kinyert blasztomereken, és a humán gyakorlattal megegyezően a terheltséget nem hordozó embriók kerülnek csak beültetésre.

Jelenleg öt fontos terheltség azonosítására alkalmas génpróba érhető el a tenyésztők számára, és alkalmas arra, hogy felhasználásukkal a preimplantációs diagnózis számára egy-sejt PCR reakciókat tervezhessünk.

Az egyik legfontosabb terheltség a CD18 gén pontmutációja okozta recesszív, letális terheltség, a szarvasmarha leukocita adhéziós deficiencia (BLAD) (JÁNOSA és mtsai, 1999). 1992-ben a genetikailag tesztelt holstein fríz bikák 14.1%-a, a tehenek 5.8%-a volt hordozó az USA-ban. Dániában a tesztelt bikák 21.4%-a és a tehenek 4.66%-a (JÖRGENSEN és mtsai, 1993), Magyarországon pedig a bikák 11.1% és a tehenek 9.8%-a bizonyult hordozónak (ZSOLNAI és FÉSÜS, 1996). A BLAD terheltség mellett kapp-

kazein genotipizálására is alkalmas tesztet is kidolgoztak (KIRILENKO és GLAZKO, 1995). Magyarországon ZSOLNAI és FÉSÜS fejlesztettek ki egy megbízható PCR-RFLP diagnosztikai eljárást 1997-ben.

Az argininoszukcinát szintetáz deficiencia, más néven citrullinémia, a holstein fríz fajtában jelentkező autoszomális recesszív terheltség. A terheltségben szenvedő borjak nem képesek az ammónia kiválasztására, a rendellenesség a születés utáni egy hetes korban, az idegrendszer károsodása miatt bekövetkező borjú elhalást okoz (HARPER és mtsai, 1986). A terheltség egyetlen, a hatvanas években széleskörűen használt Gray-View Crisscross nevű amerikai bika révén került Ausztráliába. 1990-ben 367 csúcsbika szűrésekor az USA-ban csak egyetlen hordozót találtak (THOMSEN és NIELSEN, 1991; ROBINSON és SHANKS, 1993).

Az uridin monofoszfát szintetáz deficiencia (DUMPS), szintén a holstein-fríz fajtát veszélyeztetve, a vemhesség negyvenedik napján embrióelhalást okoz. A terheltség szűrését 1988-ban kezdték el. A legtöbb hordozó közös őstől származik, a betegség visszavezethető egy széleskörűen használt, a Happy-Herd Beauticianra nevű, korának egyik legkiválóbb amerikai bikájára. A tesztelt állomány 34%-a hordozónak bizonyult Európában, ami az állatok szoros rokonsági fokára is utal. A terheltséget tenyészbikák is hordozták (SHANKS és ROBINSON, 1993). A jelenség felfogható figyelmeztetésként is. Jól szemlélteti, hogy milyen kockázattal járhat egyes bikák túlzott preferenciája és a genetikai változatosság lecsökkenése. A terheltség számára kidolgozott első PCR tesztől 1994-ben számoltak be (SCHWENGER és mtsai, 1994). Magyarországon 1151 állaton elvégezve a vizsgálatot, mindössze két hordozót, egy import bikát és egy bikanevelő tehenet találtak (0,17%). A terheltség ritka előfordulása Magyarországon nem indokolja a széleskörű szűrést (FÉSÜS és mtsai, 1999).

A miofoszforiláz deficiencia charolais fajtában izomgyengeséget és kiszáradást okoz. Mivel a terheltség a humán McArdle betegség analóg formája, a betegség szarvasmarhán végzett vizsgálata jó modell lehet a humán terápia számára. A cDNS a mutáns géntermék alapján 1996-ban készült el, amit a terheltség azonosítására szolgáló genetikai teszt rá két évvel követett (BILSTROM és mtsai, 1998).

A szarvasmarha alfa-mannozidózisa a Magyarországon kevésbé jelentős Galloway, angus, murray grey és brangus fajtákon a cukorháztartást és a glükoprotein szintézist érintő

mutáció. Ausztráliában a tesztelt vörös angus állomány 5.4%-a bizonyult heterozigóta hordozónak (BERG és mtsai, 1997).

A szarvasmarha örökletes terheltségeit egy folyamatos frissítésű, <http://www.angis.su.au/Databases/BIRX/omia/> című Internetes adatbázis, az Online Mendelian Inheritance in Animals (OMIA) tartja nyilván.

Multiplex PCR reakciók révén egyszerre több genetikai tulajdonságot is lehet vizsgálni (HOCHMAN és mtsai, 1996). Ilyen lehet az ivar, kappa-kazein és a terheltségek, BLAD, DUMPS szimultán vizsgálata (AGRAWALA és mtsai, 1992; SCHELLANDER és mtsai, 1993; SCHWERIN és mtsai, 1994).

1999 és 2002 között a szarvasmarha embriók preimplantációs diagnózisa számára felhasználható embrióbiopszia módszerének kidolgozásában vettem részt. Egérmodellen tanulmányoztam a beavatkozás embrió és magzatkárosító hatását, majd a megfigyeléseket összevetettem az *in vitro* előállított szarvasmarha embriók biopsziát követő *in vitro* fejlődési képességének eredményeivel.

4.2. *In vitro* létrehozott szarvasmarha embriók mikroaspirációs biopsziája - módszertani protokoll

4.2.1. Célkitűzés

1999-ben az ASMO nukleusztenyésztési rendszer számára preimplantációs korú, *in vitro* létrehozott szarvasmarha embriók mikroaspirációval végzett embrióbiopsziájának módszertani, protokollszerű kidolgozása volt a feladatom. A Mezőgazdasági Biotechnológiai Kutatóközpontban is meghonosított eljárást genetikailag jellemzett embriókból kialakítandó embrióbank megvalósításához szükséges technológia elemeként kívánjuk felhasználni. A jelenleg is folyamatban levő, technológiafejlesztésre irányuló kísérletek első szakaszában az embrióbiopsziának az *in vitro* továbbfejlődésére gyakorolt hatását vizsgáltuk.

A módszer kidolgozásához a WILTON és TROUNSON által 1989-ben egérembriók biopsziájáról, és MACHÁTY és mtsai. által 1993-ban közölt eljárások szolgáltak alapul. A

módszer számára csak két kapillárisra, az embriót rögzítő holder, és a blasztomert eltávolító aspirátor kapillárisra van szükség. A kompaktálódás előtti fejlettségi állapotú embriók zona pellucidáján az aspirációhoz szükséges nyílást a mikroköszörüléssel előállított, éles és hegyes aspirátor kapillárisal lehet elvégezni.

4.2.2. Anyag és módszer

4.2.2.1. Mikrokapillárisok készítése

Lehetőleg a mikromanipulációt megelőző napon kell - a művelet időigényessége miatt - a mikrokapillárisokat elkészíteni. A kapillárisok hőlég-sterilizálása is több órát vesz igénybe. Az üvegeszközökből a biopszia során eltömődő, szennyeződő, sérülő kapillárisok pótlása céljából a szükségesnél mindig többet kell készíteni. (A mikromanipuláció alatt kapilláris készítésre már nem áll rendelkezésre elegendő idő.) Az üvegeszközöket vékonyfalú boroszilikát üvegcsövekből lehet elkészíteni (Sutter -B 100-75-10, Leitz A 520119, Clark-GC100-T15) horizontális kapilláris húzóberendezések segítségével (Sutter P-97, Bachoffer) (35. ábra).



35. ábra: Sutter P-97, és Bachoffer gyártmányú kapillárishúzó

A programozható Sutter kapillárishúzó számára javasolt, előre beprogramozható beállítási értékeket az 12. táblázat tartalmazza.

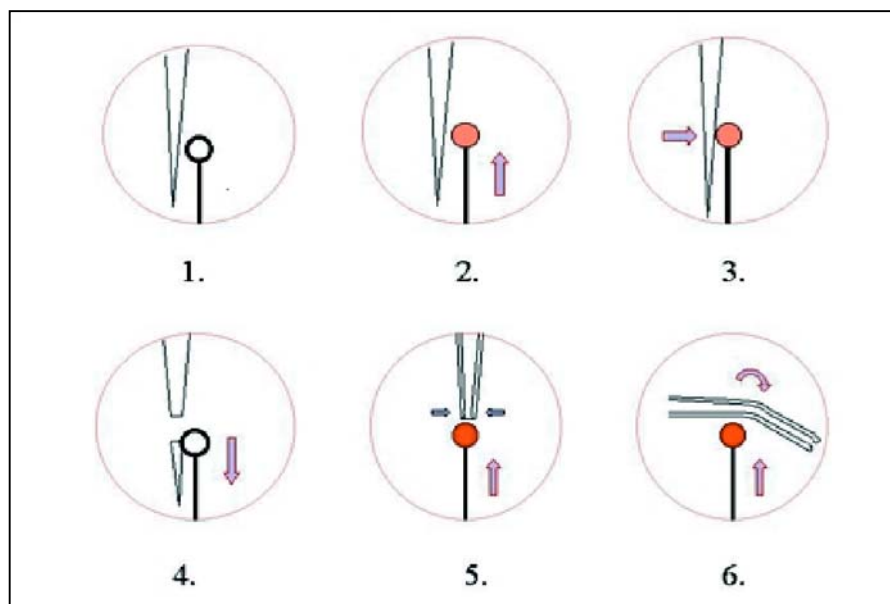
	Üveg típus	
	Sutter, B 100-75-10	Leitz, A 520119
Kapilláris	aspirátor	holder
RAM teszt	229	231
P	300	300
Heat	230	230
Pull	60	40
Vel	60	60
Time	80	100

12. táblázat: A Sutter P-97 kapilláriskészítő program beállítási paraméterei

Holder kapilláris készítése

A legalább 40-50 μm külső átmérőjű kapilláris feladata, hogy a mikromanipuláció alatt, a 10-20 μm -es átmérőjű szájadékán keresztül kifejtett szívóhatás segítségével, a mikromanipuláció alatt az embriót szilárdan rögzítse, megakadályozva annak elfordulását.

A kapilláris húzás után a Narishige MF-90 mikrohutával történő kapilláriskészítés általam javasolt lépéseit a 36. ábra mutatja be.



36. ábra: Holder kapilláris készítése mikrohutával.

1. A nyers kapilláris hegyét a platinaszálon kialakított üveggyöngyhöz mozgatjuk (1), és az üveggyöngyöt a mikrohuta mikroszkópjának objektíve előtt befogott platina szálra kis áramerősséget engedve enyhén megolvasztjuk (2)
2. A kapillárist 40-50 μm külső átmérőnél az üveggyöngyhöz érintjük (3), hogy a kapilláris fala az üveggyönggyel, igen kis felületen összeolvadjon. A mikrohuta lábkapcsolójával az áram platinaszálon átfolyását megszakítjuk. A lehűlő platinaszál a kapillárist a beolvadási ponton egyenletes, fragmentálatlan törésfelületet képezve elszakítja (4)
3. A letört végű kapillárist az üveggyöngy fölé mozgatjuk, és az üveggyöngy hevítése során felszabaduló hővel a szájadékot 10-20 μm -esre olvasztjuk, lekerekített felületet kialakítva (5).
4. A kapillárist derékszögben elforgatjuk a végétől kb. 150 μm hosszúságnál a hevített üveggyöngy felett 30°-ban lehajlítjuk (6).

Aspirátor kapilláris készítése

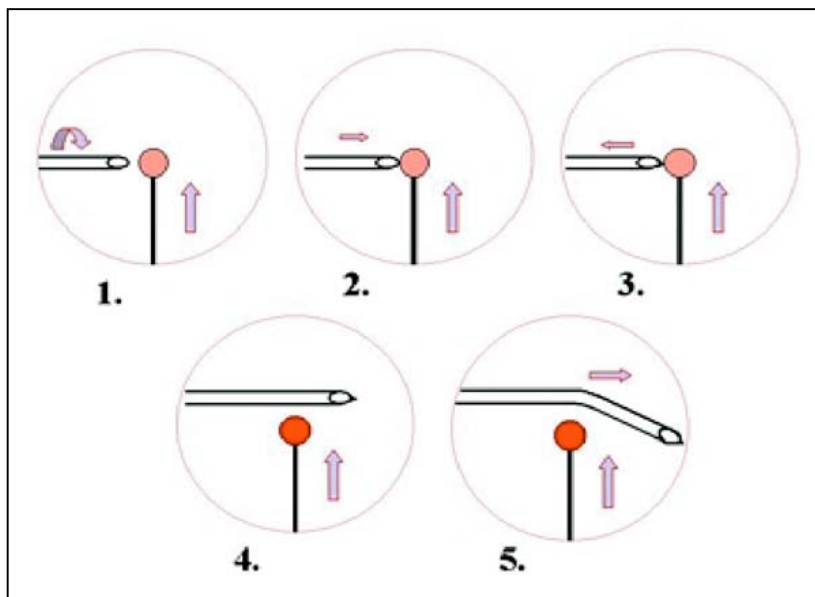
A kapilláris elkészítéséhez mikrohután kívül mikroköszörűre is szükség van (37. ábra).



37. ábra: Narishige EG4 mikroköszörű

1. A nyers, belső filamentumot nem tartalmazó, tűhegyű kapillárisokat a mikrohuta üveggyöngyének segítségével 30-35 μm ármérőnél törjük el.
2. A pipettát a Narishige mikroköszörű (EG-4), befogó csavarjával a mikroköszörű süllyeszthető kapillárstartójához erősítjük.
3. A pipettára merőlegesen éles pontfényt bocsátunk, és a kapillárist lassan leengedjük a nedvesített, forgó köszörűkő felületére. A megfelelő szint elérését a pipetta hegyének és az árnyékának az egy pontban való találkozása jelzi, amit nagyító lencsével figyelhetünk meg.
4. 10 másodpercnyi köszörülést követően a pipettát a makrocsovar segítségével felemeljük, kiszabadítjuk, és a nem köszörült végéhez illesztünk egy 20 ml-es műanyag fecskendőhöz csatlakoztatott vékony gumicsövet.
5. A pipetta köszörült végét egy steril MQ vizet tartalmazó edénykébe mártjuk, miközben a kapillárison a fecskendő segítségével levegőt fújunk át. A légbuborékok eltávolítják a köszörüléskor keletkező üvegtörmelékét.

A leköszörült pipettának formázását a mikrohutával fejezzük be, amit az 38. ábra szemléltet.

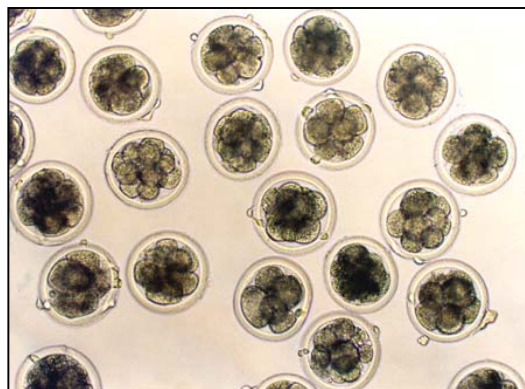


38. ábra: Szűrötüske készítése az aspirátor kapillárisra

1. Kapilláris ovális alakú szájadékát magunk felé fordítjuk (1), és k a peremét nagyon finom a gyengén megolvasztott üveggyöngyhöz érintjük (2).
2. Amint a perem beleolvad a gyöngybe, finoman visszahúzzuk a kapillárist (3), amivel egy vékony, a zona pellucida átlukasztását szolgáló tűszerű hegyet alakítunk ki.
3. A kapillárist kb. 150 μm hosszúságnál (4) a hevített üveggyöngy felett 30°-ban lehajlítjuk (5).

4.2.2.2. Az embriók előállítása *in vitro*, és a biopsziához való előkészítésük

A mikroaspirációs biopszia módszerét vágóhídról származó petefészkekből nyert petesejtek termékenyítésével előállított embriókat használtunk fel. A kidolgozott módszert ezt követően élő, egy éves üszőkből, és előhasi üszőkből ovum pick up-pal kinyert, *in vitro*, célpárosítási terv szerint termékenyített petesejtekből létrehozott embriók biopsziájához alkalmaztuk. Az *in vitro* embriótenyésztő médium SOFaaci +5% FCS volt. A beavatkozást a termékenyítés után 110-120 órával, 32 sejtes állapotban megkezdődő kompaktálódás előtt, 8-16 sejtes fejlettségi állapotú embriókon végezhető el (39. ábra).



39. ábra: 8-16 sejtes szarvasmarha embriók

A beavatkozás optimális időpontjának a termékenyítést követő 94-96. órát találtuk (94-96 hpi), amikor az embriók többsége már 16 sejtes fejlettségű. Az embriókat a sejtek közötti szoros kapcsolatok fellazításának érdekében 20 percen keresztül 38,5°C-os pH 7,2 kémhatású Ca^{2+} és Mg^{2+} mentes PBS+1mg/ml PVA oldatban inkubáltuk.

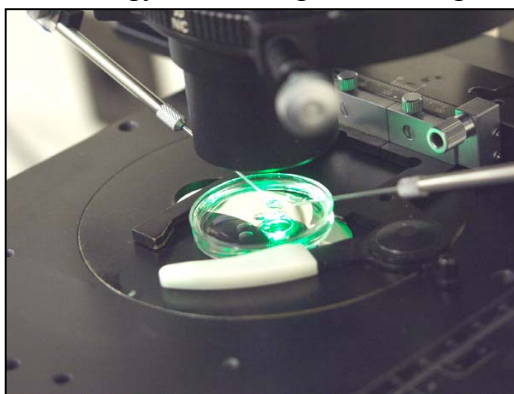
4.2.2.3. A mikromanipuláció folyamata

Az inkubáció után a mikromanipulációt TALP-HEPES médiumban, 3,5 cm átmérőjű műanyag Petri csésze fedélből kialakított mikromanipulációs edényben végeztük Leitz mikromanipulátorokkal felszerelt Leitz, illetve Narishige mikromanipulátorokkal felszerelt Olympus inverz mikroszkópokon (40. ábra).



40. ábra: Narishige mikromanipulátorok Olympus IMT-2-es inverz mikroszkópon

A fűtött mikroszkóp tárgyasztalon a baloldali holder kapillárist a mikromanipulációs szintre süllyesztve, a képmező centrumában fixáltuk, az embriók cseppen belüli keresését és a mikrocseppek közötti váltást a tárgyasztal mozgásával végeztük (41. ábra).



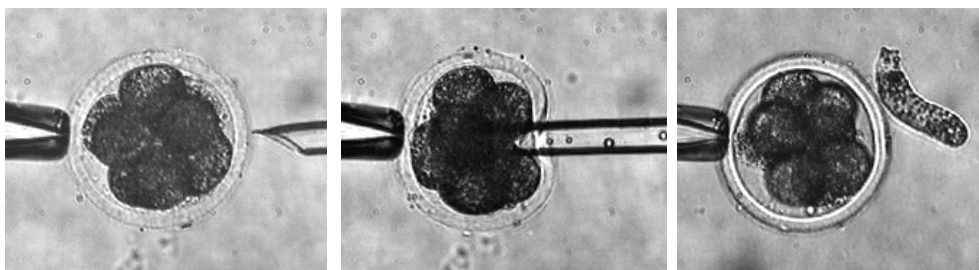
41. ábra: A mikromanipulátor fegyverzetek és a mikromanipulációs edény elhelyezkedése

A zona pellucida felsértését és a blasztomer eltávolítását a jobboldali mikromanipulátor vezérlőegységével irányítottuk. A sejt kiszívását egy mikro és makrocsavar szabályozta, finommechanikával felszerelt fecskendő segítségével végeztük (42. ábra).

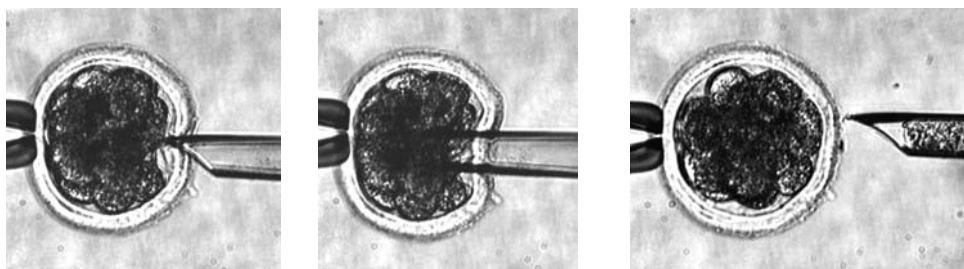


42. ábra: Hidraulikus vezérlő és aspirátor egység

A biopszia lépéseit a 43., és 44. ábrákon lehet végigkövetni.



43. ábra: Nyolcsejtes embriók biopsziája

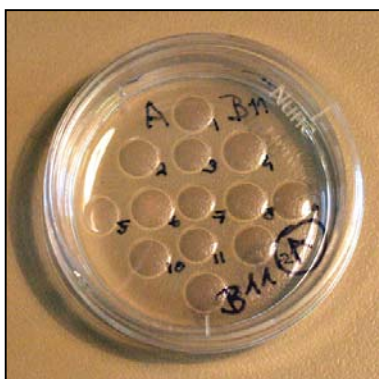


44. ábra: 16-sejtes embriók biopsziája

(A felvételek VHS mozgóképek digitalizálásával készültek.)

Az embriót a holder kapillárisban létrehozott szívóhatás segítségével 9 óra pozícióban rögzítettük, majd egy gyors, rövid, ütősszerű mozdulattal, az aspirátor kapillárisának hegyével átdöftük a zona pellucidát és a kapillárist áttoltuk a sérülésen. Az aspirátor

kapilláris ovális szájnyílását egy blasztomerre illesztettük, majd a kapillárisban gyenge szívóhatást létrehozva megkezdjük a leválasztást. Sokszor a kapilláris vékonyabb, mint a blasztomer átmérője, ezért a kapillárisba a szívás és fújás óvatos váltogatásával lehet a képlékeny sejtet bejuttatni. Igen fontos, hogy a membrán a biopszia során ne sérüljön meg, mert a sejtmag DNS-e kiszabadulhat, és ez lehetetlenné teszi a genetikai vizsgálatot, valamint szennyezheti az aspirátor kapillárist. A biopszia kivitelezésekor figyelmet kell arra is fordítani, hogy se hímivarsejt, se kumuluszsejt ne kontaminálja a mintát. Az edényenként 10-15 percet igénybe vevő mikromanipuláció után az embriókat egyedileg, megszámozott, 10 µl-es mikrocseppekbe helyezzük, amikben vagy a blasztocisza állapot eléréséig, vagy csak a genetikai vizsgálat végéig tenyésztjük az embriókat (45. ábra).



45. ábra: Egyedi embriótenyésztés számára kialakított kultivációs edény

A blasztomerek a mikromanipulációs cseppekben maradnak, majd egyedileg, sztereo mikroszkóp alatt Ca^{2+} és Mg^{2+} mentes PBS+1mg/ml PVA cseppekben háromszor, MQ vízben egyszer átmoszuk őket. Egy 45°-ban meghajlított, 50 µm átmérőjű kapillárisal 2 µl steril MQ vizet tartalmazó PCR csőbe helyezzük, szintén sztereo mikroszkóp alatt. Csak akkor lehetünk biztosak abban, hogy a genetikai vizsgálat számára a minta ténylegesen a rendelkezésre áll, ha a kapilláris eltávolítása után a PCR cső alján meglátjuk a blasztomert.

A biopszia lefolyásáról jegyzőkönyvet kell vezetni. Fel kell tüntetni a kezelés idejét, a felhasznált médiumokat, az embriók fejlettségét és minőségét (IETS szabvány alapján), és a biopszia sikerességét (az embrió és a blasztomer is épen maradt). Feljegyezzük a

tenyésztőcsepp számát és a blasztomert tartalmazó PCR cső számát is, hogy a genetikai vizsgálatot követően egyértelműen azonosítani lehessen az embriót.

4.2.3. Eredmények

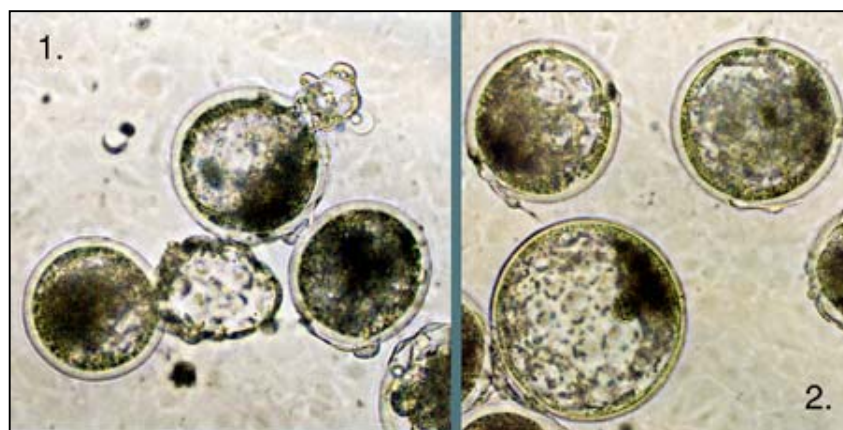
A biopszia sikerességét az embriók minősége döntően befolyásolja. Jó minőségű – sejtfragmentumokat nem tartalmazó, ép membránú blasztomerekből álló embriók esetén a beavatkozás 90-95%-ban eredményesen végrehajtható. A mikromanipuláció embrióként mindössze fél- másfél percig tart.

4.2.3.1. Biopszán átesett embriók *in vitro* továbbfejlődési képessége

A mikromanipulációt követő *in vitro* továbbfejlődési képesség vizsgálatához az embriókat 400 µl térfogatú SOFaaci+5% FCS tenyésztőmédiumban csoportosan tenyésztettük tovább. A továbbfejlődési képességet a tenyésztés harmadik napján bíráltuk el.

Az embriók minősége

A biopsziát követő tenyésztés harmadik napján (d7) a biopsziázott embriók zona sérülésén keresztül megkezdődött a hólyagcsírák trofektoderma sejteinek kitüremkedése (46. ábra, 1.), amíg a kontroll blasztociszták megkezdték a blasztocöl nyomásemelkedés miatti méretnövekedésüket (46. ábra, 2.).



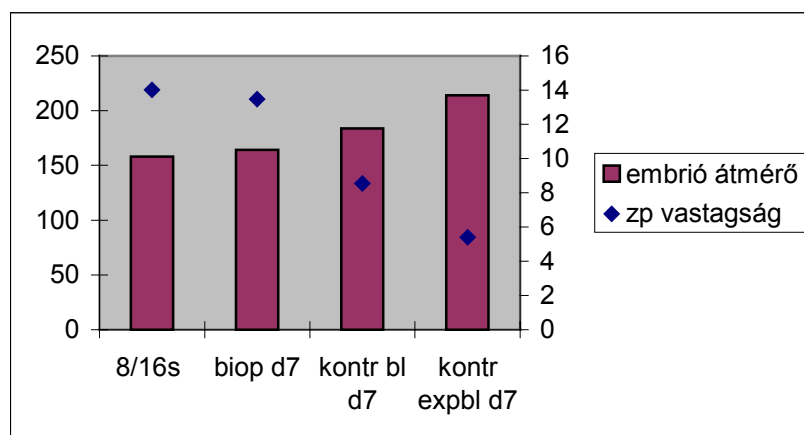
46. ábra: Biopsziázott és kontroll embriók (d7).

Az expandálódó hólyagcsírák zona pellucida vastagsága megközelítően a zigóták zona pellucidájára jellemző méret felére csökkent. A biopsziázott embrióknál nem tapasztaltam a peteburok ilyen mértékű elvékonyodását. Ennek következményeként, mialatt a következő napon a kontroll embriók kibújnak a zona pellucidából, a biopsziázott embriók többsége csak részlegesen képes erre, az embriók egy része nem képes elválni a peteburoktól (47. ábra)



47. ábra: A zona pellucidán részlegesen kibújt embrió (d8)

Az embriók méreteinek a fejlődés során bekövetkező változását a 48. ábra szemlélteti.



48. ábra: Az embriók átmérőjének és a zona pellucidának méretei (μm).

8-16 s: 8-16 sejtű embriók a biopszia előtt, biop d7: biopsziázott embriók (d7), kontr bl d7: kontroll blastociszták (d7), kontr expbl d7: kontroll expandálódott blastociszták (d7) Bal oldali ordinátán az embrió átmérőjét, a jobb oldali ordinátán a zona pellucidán ábrázoltam.

Az embriók továbbfejlődési képessége

Az embriók *in vitro* továbbtenyésztési adatait az 13. táblázat mutatja be.

	Embriók száma	Blasztociszták %-os aránya	±SD
Kontroll embriók	69	37,7	±16,8
Biopszázott embriók	67	38,5	±17,8

13. táblázat: A biopsziázott és kontroll embriók *in vitro* továbbfejlődési képessége

4.2.3.2. Az embrióbiopszia gyakorlati alkalmazásának eredményei

Az ASMO nukleusztenyésztési rendszer keretén belül 12 program során üszők és előhasi üszők ovum pick up-pal kinyert petesejteiből *in vitro* termékenyítéssel előállított embrióit az embriótenyésztés negyedik napjának végén mikromanipuláltuk. A mikromanipuláció után a hímivar kimutatására alkalmas BrY4a primereket felhasználó PCR próbával határoztuk meg az embriók nemét, az Agricultural Research Centre belső használatra kidolgozott protokollja szerint (BREDBACKA és mtsai, 1995). A különböző fejlettségű embriókon végrehajtott biopszia sikerességének adatait (ép membránnal rendelkezik a kinyert blasztomer és ép marad az embrió is) a 14. táblázat tartalmazza.

fejlettség	8 sejtes	>8 sejtes	16 sejtes	Összes
biopsziázott (db)	24	33	45	102
sikeresség	75%	93,9%	100%	92,2%

14. táblázat: A biopszia sikeressége az embriók fejlettségi állapota szerint

Tíz program esetén volt sikeres a biopsziát követő egyedi továbbtenyésztés (15. táblázat).

Biopsziázott embriók száma	Továbbfejlődött, ismert ivarú embriók % aránya (±SD)	Nőivarú embriók száma	Hímivarú embriók száma
----------------------------	--	-----------------------	------------------------

86	40,2 ($\pm 19,9$)	17	16
----	---------------------	----	----

15. táblázat: Azonosított ivarú embriók *in vitro* továbbfejlődése
Az ASMO nukleusz tenyésztési program ovum pick up-pal kinyert petesejtjeiből létrehozott embrióinak mikroaspirációval történő embrióbiopsziát követő szexálása során öt nőivarú embriót ültettünk recipiens ayrshire nőtényekbe. Az ültetések eredményeként 2000-ben két üszőborjú született meg.

4.2.4. Következtetések, javaslatok

Kísérleteimben a szarvasmarha preimplantációs genetikai diagnózis számára egy mechanikus mikroaspirációs biopsziás módszeren alapuló mikromanipulációs technológiát dolgoztam ki, amit Finnországban, gyakorlati célú embrió-előállítási programokban is felhasználtunk. A beavatkozás *in vitro* embriófejlődésre gyakorolt hatásának megfigyelését Magyarországon végeztem el, a technológiát sikeresen integrálva a hazai, a dolgozat előző felében már bemutatott, *in vitro* embrió-előállító rendszerbe.

4.2.4.1. Megjegyzések a mikromanipulációs módszerhez

Eredményeink alapján megállapítható, hogy a mikromanipuláció gyorsan és hatékonyan végrehajtható. Az embriók Ca^{2+} , Mg^{2+} mentes PBS-ben történő előinkubációja megkönnyíti a blasztomerek épségben történő eltávolítását.

A beavatkozást tapasztalataim szerint, a biopszia sikerességi mutatói alapján érdemesebb 16 sejtes fejlettségű embriókon elvégezni. Ekkor a blasztomerek mérete az előző stádiumhoz képest a felére csökken, ezért sokkal könnyebben kinyerhetők úgy, hogy a sejt membránja ép maradjon, és ne következzen be blasztomerlízis, ami szükségessé teheti még egy blasztomer kinyerését – ami a nyolc-sejtes embrió térfogatát a kiindulási petesejt térfogatának 75%-ára csökkenti. 16 sejtes embrió esetén, még két blasztomer eltávolítása után is, az embrió térfogata csak 12,5%-kal csökken. Ha a későbbi fejlettségi állapotban végzzük el a beavatkozást, lehetőségünk nyílik arra is, hogy az embriótenyésztés 4. napján (d4) csak azokat az embriókat mikromanipuláljuk, amelyek túljutottak a kritikus nyolc-sejtes stádiumon, amikor fejlődési blokk léphet fel.

4.2.4.2. Megjegyzések az embriók *in vitro* továbbfejlődéséhez

Az biopsziázott embriók *in vitro* továbbfejlődési képessége arányaiban a kontroll csoporthoz képest nem tért el. Eredményeink e tekintetben összhangban állnak a CHRENEK és mtsai által 2001-ben leírt megfigyelésekkel. A biopsziát követő tenyésztés harmadik napján azonban, mialatt a kontroll blasztociszták megkezdték a zona pellucida elvékonyodását okozó méretnövekedésüket (az expandált blasztociszta átmérője 200 μm körüli, zona pellucidájának vastagsága 5-6 μm), a biopsziázott embriók trofektoderma sejtjei a biopszia előtti embriók zona pellucida vastagságánál (14 μm) alig vékonyabb zona pellucida sérülésén keresztül már megkezdték a kitüremkedést, miközben a zona pellucida átmérője alig változott.

Az átlagosan 92,2%-ban sikerrel végrehajtható embrióbiopsziás eljárás felhasználhatóságát a gyakorlatban is sikerült bizonyítani: nagy tenyészértékű donoroktól származó petesejtekből célpárosítással létrehozott embriók szexálását követően sikerült utódokat létrehoznunk.

MOET programokban, a hólyagcsíra, vagy kompakt morula állapotban kimosott embriók esetében a gyakorlati alkalmazás számára a lényegesen egyszerűbb, mikropengével történő, kis műszerigényű embriódarabolás javasolható inkább. Ennek az eljárásnak az előnye, hogy a genetikai vizsgálat számára több sejt különíthető el, és kivitelezése akár farmkörülmények között is lehetséges. A mikromanipulátort nem, de nagy technikai tapasztalatot igénylő, pusztán kézzel való felezés csupán egy fűthető tárgyasztallal rendelkező sztereo mikroszkóp segítségével is végrehajtható. A beavatkozást azonban az esetben is csak felkészült szakember képes megbízhatóan kivitelezni.

Az *in vitro* létrehozott embriók számára kidolgozott mikroaspirációs módszer alkalmazása, műszer, és szaktudás igénye miatt főleg preimplantációs genetikai diagnózison átesett embriókból létrehozandó, kereskedelmi célú embrióbank kialakítása esetén indokolt. Legújabb megfigyeléseink szerint a mikroaspirációs módszerrel biopsziázott egér és

szarvasmarha embriók előhűtött fémfelületen mikrocseppben történő vitrifikációját követően kiváló túlélést és továbbfejlődést lehet elérni (BARANYAI és mtsai, 2003)

4.3. Egyszerűsített embrióbiopsziás eljárás kidolgozása, a beavatkozás embrió- és magzatkárosító hatásának vizsgálata egérmodellen

4.3.1. Célkitűzés

A preimplantációs korban végzett embrióbiopszia *in vitro* embriófejlődésre gyakorolt hatása szarvasmarha *in vitro* embrió-előállító rendszerben is vizsgálható, de a mikromanipuláció magzati életre gyakorolt esetleges károsító hatásának megfigyelését a költségek és a vemhességi idő figyelembevételével csak egérmodellen tudjuk tanulmányozni.

Az embrióbiopszia hatásának egérmodellen való vizsgálatához első lépésben egy egyszerűen kivitelezhető biopsziás eljárást kellett kidolgozni.

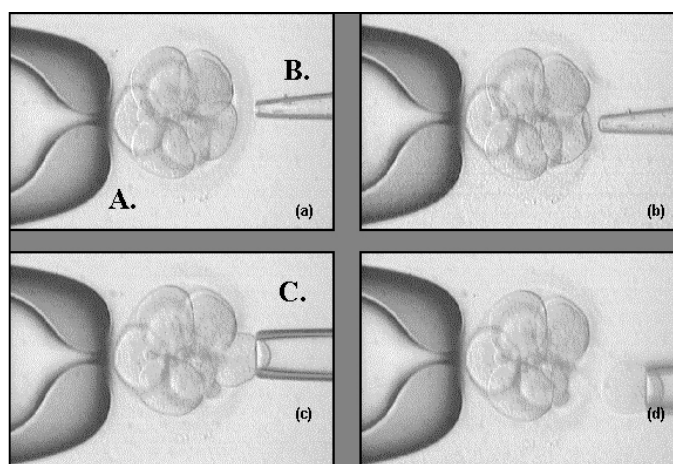
Kísérleteink során a biopszián átesett embriók *in vitro* továbbfejlődési képességét és recipiens állatokba való beültetést követő magzati fejlődését kívántuk megfigyelni.

4.3.2. Az egérembriók biopsziájának irodalmi háttere

Az elmúlt tizennégy év során, az egér embriókon kifejlesztett mikromanipulációs eljárások szolgáltatnak kísérleti alapot a humán (HANDYSIDE és DELHANTY, 1997) és az állattenyésztési preimplantációs genetikai diagnózis (BODÓ, 2001; BREDBACKA, 2001) technológiai fejlesztése számára. Főleg a humán terápia támaszkodik az egérmodellen kapott eredményekre. Az egérembriókból, akárcsak az emberi és az *in vitro* előállított szarvasmarha embriókból, leggyakrabban mikroaspiráció segítségével távolítják el a genetikailag vizsgálni kívánt sejteket.

Egérnél a legjobb embrió túlélést a kompaktálódást megelőzően (nyolc-sejtes fejlődési állapotig) végrehajtott mikromanipulációval lehet elérni (KRZYMINSKA és mtsai, 1990). A mikromanipulációt megelőzően ajánlatos a szoros sejtközzötti kapcsolatok Ca^{2+} - és Mg^{2+} - mentes PBS-ben történő fellazítása, hogy az aspiráció során blasztomerek egymástól könnyen elválaszthatók legyenek (VAN BLERK és mtsai, 1991; DUMOULIN és mtsai, 1998).

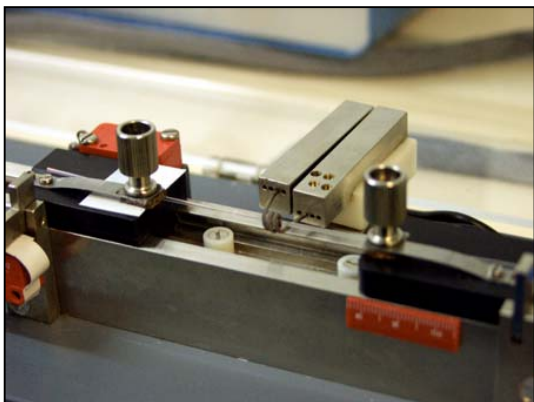
A blasztomerek eltávolítását aspirációval végzik a zona pellucidán kialakított nyíláson keresztül. A nyílás létrejöhet mikroköszörüléssel készített éles mikrokapillárisnak a zona pellucidán való mechanikus átdöfésével (WILTON és TROUNSON, 1989), irányított lézerrel történő átégetéssel, vagy készülhet a peteburok részleges savas emésztése révén is. A humán gyakorlatban az egérmodellen eredetileg hólyagsírák peteburokból való kikelésének megkönnyítésére kidolgozott savas, részleges emésztési eljárást használják széleskörűen. A biopsziához általában három, különböző mikromanipulátorral mozgatott kapillárist használnak (49. ábra).



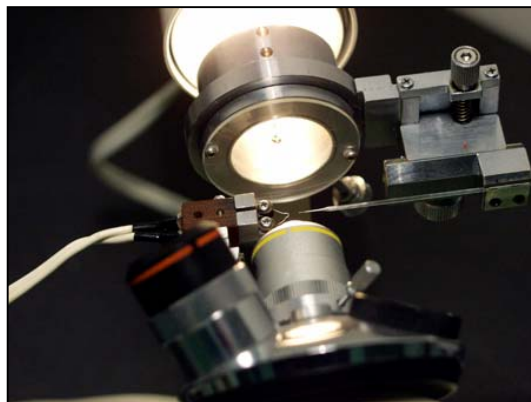
49. ábra: Humán embrió savas emésztéses embrióbiopsziája.

A.: holder kapilláris B.: drilling kapilláris C.: aspirátor kapilláris

A vékony, 7-10 μm szájnyílású, ún. drilling kapilláris segítségével pH 2,4 kémhatású acid-Tyrode (AT) médiumot (HOGAN és mtsai, 1994) fecskendeznek a zona pellucidára (GORDON és GANG, 1990) (49. ábra (a)). Az embriót a beavatkozás ideje alatt az ún. holder kapilláris támasztja meg. A zona pellucidán keletkezett kör alakú nyíláson (48. ábra (b)) keresztül az aspirátor kapilláris segítségével lehet a blasztomert kiszívni (49. ábra (c-d)). A kapillárisok elkészítéséhez csak kapilláris húzó berendezésre (50. ábra) és mikrohutára (51. ábra) van szükség, szemben a zona pellucidát mechanikailag átdöfő eljárással, ahol a hasítékot képző, és egyben a blasztomert kiszívó kapillárist viszonylag bonyolultan, több lépésben, mikrohutával történő mikroolvasztás és mikroköszörülés útján lehet csak létrehozni.



50. ábra: Kapilláris húzó



51. ábra: Mikrohuta

CHEN és munkatársai 1997-ban ismertettek egy egyszerűsített, csupán két kapillárist igénylő eljárást, amelyben a zona pellucidára AT oldatot juttató és a blasztomert eltávolító kapillárisokat egyesítették. Egy évvel később az egér modellen szerzett tapasztalatok alapján a munkacsoport a humán alkalmazást is bemutatta (CHEN és mtsai, 1998). Az eljárás során az aspirátor kapillárist AT oldattal töltik fel, és azt a zona pellucidára juttatva nyílást képeznek. Az embrionális sejt kiemelése előtt az aspirátor kapillárisból a savas médiumot el kell távolítani, nehogy a blasztomer membránját károsítsa. A blasztomer aspirációja után a kapillárist egy AT cseppből újra kell tölteni. A bonyolult töltési, és ürítési lépések az eljárást jelentősen lelassítják.

4.3.3. Anyag és módszer

Mivel a preimplantációs korú embriókon végzett mikromanipulációs eljárásnak a magzati fejlődésére gyakorolt hatását kívántuk vizsgálni, első lépésben kidolgoztunk egy, az eddigieknél jóval egyszerűbb, új, savas emésztéses biopsziás eljárást.

4.3.3.1. Az embriók előállítása és in vitro tenyésztése

6-8 hetes életkorú C57Bl6/CBA F1 nőstény egereket (*Mus musculus*) 5 IU PMSG-vel (Sigma, St. Louis, MO), majd 46 órával később 5 IU hCG-vel szuperovuláltattunk (HOGAN és mtsai 1994). A C57Bl6/CBA F1 hímekkel párosztatott nőstényeket a termékenyítést követő második napon, cervikális diszlokációval öltük meg. A petevezetőkbe kimosott embriókat, M16 médiumban, egy napig, a nyolc-sejtes fejlettségi

állapot elérésig, széndioxid termosztátban, 37°C hőmérséklet, 98% relatív páratartalom mellett, 5% CO₂-t tartalmazó gázelegyen tenyésztettük tovább.

4.3.3.2. A mikropipetták készítése

Az egyszerűsített biopsziás eljárás számára csupán kétféle kapillárist kellett elkészítenünk. Mindkét kapillárist boroszilikát üvegcsövekből (GC100-15, Clark Electromedical Instruments) egy horizontális kapilláris húzó segítségével (Bachoffer) állítottuk elő. A pipetták között csupán méretbeli különbségek vannak. A holder kapillárishoz mikrohuta (Narishige) platinaszáljára olvasztott üveggyöngy segítségével 50 µm külső átmérőnél törtük el a kihúzott üveg kapilláris végét, majd 25 µm átmérőre olvasztottuk be a végét. Ezt követően a kapillárist a végétől 100 µm távolságban 20°-kal meghajlítottuk. A zona pellucida emésztéshez szükséges drilling kapillárist 10 µm átmérőnél törtük el, és 6-7 µm belső átmérőjűre olvasztottuk. Ezt követően a kapilláris hosszát 3 cm-re csökkentettük, a szélesebb végéből a maradékot gyémánt ceruzával levágva. A teljes kapillárist fecskendővel pH 2.4 kémhatású AT oldattal töltöttük fel.

4.3.3.3. Az embrióbiopszia menete

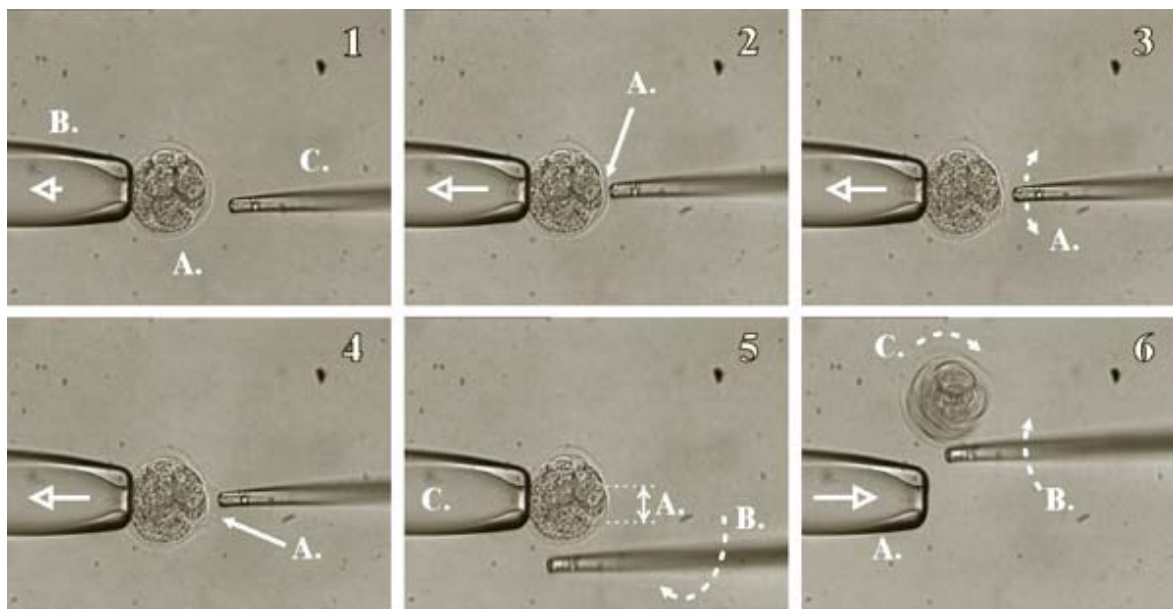
Nyolcsejtes, még nem kompaktálódó, vagy a kompaktálódást csak éppen megkezdő embriókat a sejtek közötti szoros kapcsolatok fellazításának érdekében 20 percen keresztül 37°C-os, pH 7,2 kémhatású Ca²⁺ és Mg²⁺ mentes PBS oldatban inkubáltuk. A mikromanipulációt az erre kialakított edényben, egy 3,5 cm átmérőjű műanyag Petri csésze fedelében (Greiner) végeztük.



52. ábra: Mikromanipulációs edény

Edényenként 5-8 db 10 μ l M 2 médium cseppet hozunk létre, amiket paraffin olajjal (Sigma W-2330) teljesen elfedtünk (51. ábra). Minden cseppbe egy előinkubált embriót helyeztünk. A mikromanipulációhoz inverzmikroszkóp (IMT2, Olympus) előmelegített, 37 C°-os tárgyasztalán két Narishige joystick vezérelte hidraulikus mikromanipulátort használtunk 400x nagyításon.

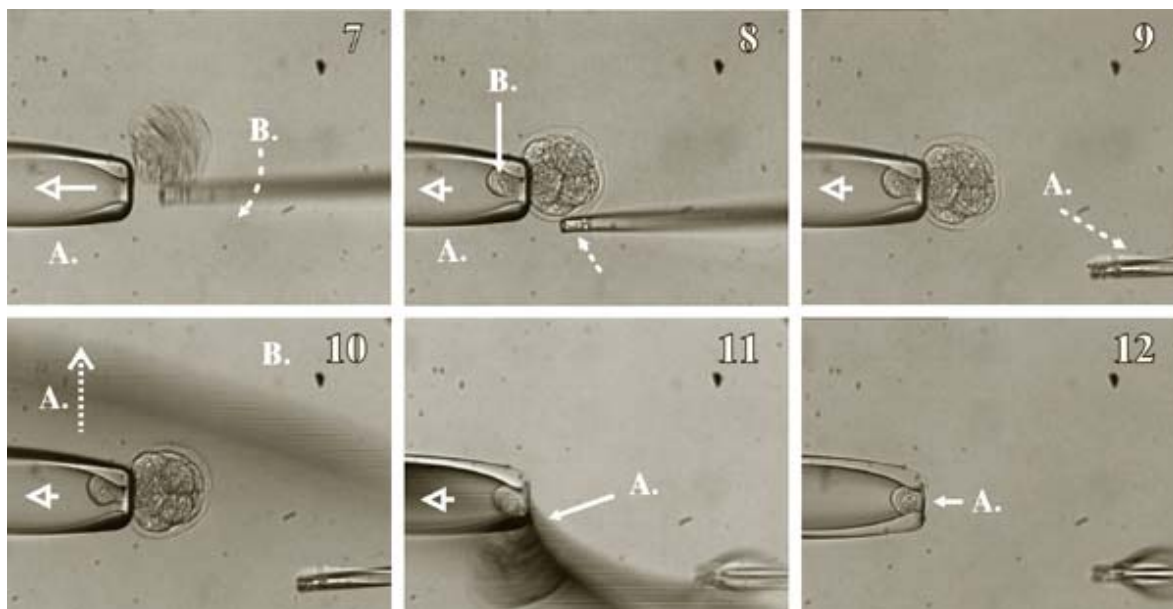
A biopszia lépéseit az 53. és 54. ábrán lehet végigkövetni.



53. ábra: Az embrióbiopszia első hat lépése.

Az embriót (1.A.) 9 óra pozícióban rögzítettük a holder kapillárisban létrehozott szívóhatás segítségével (1.B.). A drilling kapillárist (1.C.) az embrió azon részéhez közelítettük, ahol egy blasztomer a legnagyobb felületével simul a zona pellucida belső falához (2.A.). A kapilláris hegyét óvatosan 10 μ m kitéréssel vertikálisan mozgattuk, finoman érintve, egyenletesen vékonyítva a zona pellucidát (3.A.). A kiömlő sav hatására a peteburkon kör alakú nyílás keletkezett (4.A.). A 25-30 μ m átmérőjű nyíláson (5.A.) keresztül a perivitellinális térből kismennyiségű belső folyadék áramlott ki. A drilling kapillárist eltávolítottuk a zona sérüléstől (5.B.) és a holder kapillárisban megszüntettük a szívóhatást (5.C.).

A holderkapillárisból a médium fújása (6.A.) és a drilling kapilláris mozgásával (6.B.) az embriót 180°-kal elforgattuk (6.C.).



54. ábra: Az embrióbiopszia további lépései.

A holder kapillárisban újra gyenge szívóhatást hoztunk létre (7.A.) és a drilling kapilláris hegyével a zona pellucidán keletkezett nyílást a holder kapilláris szájához illesztettük (7.B.). A szívóhatást lecsökkentve (8.A.), a nyíláson keresztül, finoman kontrollálva a kapilláris üregébe szívtunk egy blasztomert, vigyázva, hogy a membránja ne sérüljön (8.B.). A drilling kapillárisal való enyhe nyomással segítettük a blasztomer kitüremkedését, majd a kapillárist eltávolítottuk az embriótól (9.A.). A tárgyasztalt mozgatva (10.A.) a holderrel tartott embriót a médiumcsepp és az olaj szemben levő határfelületéhez juttattuk (10.B.). A tárgyasztalt továbbmozgatva a holder kapilláris finoman leválasztotta az eltávolítandó blasztomert a médiumban rekedt embrióról (11.A.). (Nyolc-sejtes embriók esetén a könnyen leválasztható blasztomerek, az olaj határréteg használata nélkül, csupán a drilling kapilláris finom igazító nyomásával is leválaszthatók.) A blasztomert (12.A.) a médiumcseppbe visszahelyezett kapillárisból kifűjtük, majd a tárgyasztal mozgatásával a kapillárisokat a következő cseppbe mozgattuk, a mikromanipuláció magassági szintjének megváltoztatása nélkül. A mikromanipuláció során kizárólag a drilling kapillárist mozgattuk a mikromanipuláció horizontális síkjában, a holder kapillárist csupán vertikálisan eresztettük le a kívánt mikromanipulációs szintbe, horizontálisan nem mozgattuk.

4.3.3.4. Az embriók *in vitro* tenyésztése és recipiensekbe ültetése

A mikromanipulációt követően az embriók életképességét és fejlettségét *in vitro* továbbtenyésztés során, valamint embrió-átültetést követően *in utero* vizsgáltuk.

A biopszián átesett, valamint a nem kezelt, kontroll embriókat M2, majd M16 médiumban való átmosás után M16 médiumban tenyésztettük tovább 37°C, 98% relatív páratartalom, és 5% CO₂-mellett. Két napos *in vitro* továbbtenyésztést követően az embriók egy részének továbbfejlődési képességét a blasztociszták arányával jellemeztük. Hoechst DNS festéssel (CRITSER és FIRST, 1986) megállapítottuk az embriók sejtmag-számát. Az embriók másik részét a biopsziát követő napon a HOGAN és mtsai. (1994) által leírt módon álvemhes C57Bl6/CBA F1 recipiensekbe ültettük.

4.3.3.5. A magzatok életképességének vizsgálata

A recipiens nőtények méhéből HOGAN és mtsai. által 1994-ben leírt módon kipreparált magzatok fejlettségét három fejlődési szakaszban, a vemhesség 9. napján, a kopulációt követően (p.c.) 8 és fél nappal (magzatok életkora: 8 és fél nap p.c., korai szomita állapot), a vemhesség 13. napján, a kopulációt követően 12 és fél nappal (magzatok életkora: 12 és fél nap p.c., organogenezis folyamatának kezdete) és a vemhesség 19. napján, a kopulációt követően 18 és fél nappal (magzatok életkora: 18 és fél nap p.c., közvetlenül születés előtti állapot) figyeltük meg.

A magzatok fejlettségét és életképességét külső morfológiai jegyek alapján bíráltuk el.

A vemhesség 9. napján kipreparált magzatokat JUNG (Leica Instruments GmbH) szövetfagyasztó médiumba ágyasztuk, és folyékony nitrogénnel mélyfagyasztottuk. MICROM Heidelberg fagyasztva metsző mikrotommal 15 µm vastagságú metszeteket készítettünk hematoxilin-eozin kettős festés számára. Festés után, még nedves állapotban, a tárgylemezeket DePex-el (SERVA) fedtük és fénymikroszkóppal vizsgáltuk KAUFMAN (1990) eljárása szerint.

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

4.3.4. Eredmények

4.3.4.1. A biopszia hatékonysága

A biopszia, a kinyert blasztomerek membránjának épségét vizuálisan értékelve, 98%-ban volt sikeres. Egy embrió mikromanipulációja átlagosan fél percet vett igénybe. A Ca^{2+} és Mg^{2+} mentes PBS az edényben levő minden embrión a kívánt reverzibilis hatást fejtette ki, a sejtközötti szoros kapcsolatok a mikromanipulációt követően egy órán belül kialakultak, és a kompaktálódás megkezdődött.

4.3.4.2. Az embriók *in vitro* továbbfejlődése

Az embriók *in vitro* továbbtenyésztési adatait a 16. táblázat mutatja be. A fejlődő blasztociszták (55. ábra) sejtszámának meghatározása során a biopsziázott embriók Hoechst DNS festékkel megfestődő sejtmagjainak száma 30,9% volt a kontroll blasztocisztáknál kevesebb.



55. ábra Blasztociszta stádiumú biopsziázott, a biopszia nyílásán keresztül a kibújást megkezdő (A.), és az expandálódást megkezdő kontroll embriók (B.)

	Embriók száma	Blasztociszták %-os aránya * ($\pm$ SD)	A blasztociszták átlagos sejtmagszáma ($\pm$ SD)
Kontroll embriók	100	93,7 ($\pm$ 10,5)	86,5 ($\pm$ 8,5) ^a
Biopszázott embriók	121	92,2 ($\pm$ 6,7)	59,8 ($\pm$ 10,1) ^b

*: az ismétlések átlagában, Statisztikai analízis: Chi^2 -próba a,b: $P < 0,005$

16. táblázat: A biopsziázott és kontroll embriók *in vitro* továbbfejlődési képessége

4.3.4.3. Az embriók továbbfejlődése in utero

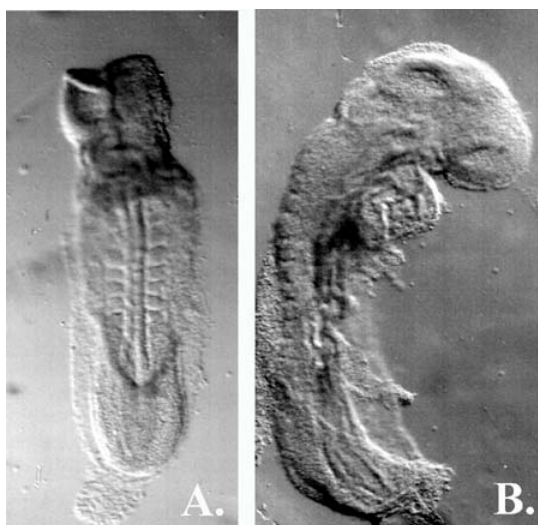
A leölt recipiensek méhéből kipreparált életképes magzatok mennyiségi arányát a 17. táblázat mutatja be. A kezelési csoportok között nem, de a csoportokon belül mindkét esetben az embriófejlődési stádiumok között statisztikailag kimutatható szignifikáns eltérést találtunk.

	Életképes magzatok %-a (beültetett embriók száma=100%)		
	8 és fél nap p.c. *	12 és fél nap p.c. *	18 és fél nap p.c. *
Kontroll embriók	77,1 ^a (70)	72,0 ^a (68)	55,1 ^b (49)
Biopsz. embriók	76,5 ^a (68)	67,1 ^{ab} (73)	58,3 ^b (60)

*Statisztikai próba: Chi² próba *: magzatok életkora; a,b: P < 0,05*

17. táblázat: Az életképes magzatok aránya a vemhesség különböző szakaszaiban

A vemhesség 9. napján a biopsziázott embriókból fejlődő magzatok (56. ábra, A.) a kontroll magzatokhoz képest méretüket és fejlettségi fokukat tekintve egyöntetűen fél - egy napos fejlődési lemaradásban voltak (56. ábra, B.) Sem a 13 napon, sem később a 19. napon ez a fejlődésbeli elmaradás nem volt már megfigyelhető.



56. ábra: Biopsziázott embrióból (A), és intakt embriókból (B) fejlődő nyolc és fél napos korú magzatok

A nyolc és fél napos magzatokat szövettani vizsgálatnak vetettük alá. A hematoxilin-eozin festés szerint mind a kontroll, mind a biopsziázott embriók embrionális rétegei épek voltak, fejlődésbeli rendellenességek, morfológiai elváltozások nem voltak tapasztalhatók.

4.3.4.4. A megszületett utódok jellemzése

A biopszián átesett embriókkal vemhes recipiens anyák, a vemhesség 19. napján, átlagosan fejlett utódokat ellettek (27 utód 44 beültetett embrióból). Az öt recipiens anyától megszületett, biopsziázott embriókból 12 hím és 15 nőstény utód született meg. Az állatokat egymással pároztattuk, három hímek két nősténnyel. A vemhességből 126 utód született meg. Az átlagos alomszám 8,4 volt. Hat F2xF2 párt párosítottunk kontroll csoportként. Ebben a csoportban 50 utód született meg, az átlagos alomméret 8,33 volt.

4.3.5. Következtetések, javaslatok

Tanulmányomban egy új, egér és humán alkalmazásra is alkalmas embrióbiopsziás módszert mutattam be, elemezve a beavatkozásnak az *in vitro* embriófejlődésre és a magzati fejlődésre gyakorolt hatását.

4.3.5.1. Megjegyzések a mikromanipulációs módszerhez

Eredményeink alapján megállapítható, hogy sikerült kifejleszteni egy gyors, hatékony és könnyen kivitelezhető mikromanipulációs eljárást, amelyhez csupán két, egyszerűen elkészíthető, mikroköszörülést nem igénylő kapilláris szükséges. Az eljárás kidolgozása során két szempontot kellett elsősorban figyelembe venni. Egyrészt a mikromanipulációt az embrióknak a legnagyobb arányban kell túlélniük, másrészt a kinyert blasztomereknek a sikeres vizsgálat számára ép membránnal kell rendelkezniük. Ennek a kettős feltételnek megfelelően alakítottuk ki az eljárásunkat. A Ca^{2+} , Mg^{2+} mentes PBS alkalmazása, különösen a kompaktálódó embriók esetében elengedhetetlen, mert nélküle - a szoros sejtközzötti kapcsolatok miatt - a holder kapilláris ellenirányú szívóhatása sejtlízist idézhet elő. Mivel a Ca^{2+} , Mg^{2+} mentes PBS hatása reverzibilis (SANTALO és mtsai, 1996), egy mikromanipulációs edénybe, az egyes beavatkozások idejét figyelembe véve legfeljebb 5 - 8 embriót célszerű elhelyezni, hogy még a legutolsó embrió sejtközzötti kapcsolatai is elég lazák lehessenek a blasztomer könnyű, és épségben való eltávolításához.

Tapasztalataink szerint nyolc-sejtes embriók esetében sokszor csupán a holder szívó hatására, vagy a drilling kapilláris 6 óra pozíciótól 12 óra pozíció felé történő óvatos pöccintésével is leválasztható a sejt az embrióról. Kompaktálódó, 10-16 sejtes embrióknál azonban csak a médiumcsepp és az olaj határrétegének segítségével történő leválasztás biztosítja a blasztomer épségét. A mikromanipuláció során az edényben utolsónak sorra kerülő embriók esetében is célszerűbb az utóbbi leválasztási módot választani.

A biopsziát megelőzően mindig több kapillárist kell előkészíteni, mert amint egy esetleges blasztomerlízis következtében bármelyik kapilláris sejttörmeléssel szennyeződik, azt azonnal ki kell cserélni, hogy a következő embriók vizsgálati eredményét az esetleges DNS kontamináció meg ne hamisítsa.

4.3.5.2. Megjegyzések az embriók in vitro továbbfejlődéséhez

Az *in vitro* vizsgált biopsziázott embriók továbbfejlődési képessége a kontrolléval megegyezett, azonos arányban bújtak ki a hólyagsírák mindkét csoportban a zona pellucidából.

Az embriók sejtmagszámát tekintve azonban lényeges különbséget találtunk, ami véleményünk szerint csak részben tudható be annak, hogy eltávolítottunk egy blasztomert, 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. Az azonos időben megfigyelt zona pellucidából való kibújás nem jelent azonos fejlettségi állapotot. A jelenségre először MALTER és COHEN hívta fel a figyelmet 1989-ben. A blasztociszták expansziója, ami természetes állapotban az embrió átmérőjének a jelentős megnövekedésével, a zona pellucida elvékonyodásával, majd felrepedésével jár, a biopsziázott embrióknál csupán részleges.

A zona pellucidán létrehozott nyíláson már az expanszió alatt megkezdődik az embrió egy részének kitüremkedése, és az embrió átmérője, illetve a zona pellucida vastagsága nem változik jelentősen (54. ábra). A biopszián átesett embriók, bár esetükben is megtörténik a zona pellucidából való kibújás, fejlettségüket tekintve fél nappal korábbi fejlettségi állapotú, a késői expandálódó blasztocisztákra jellemző sejtmagszámmal rendelkeznek.

4.3.5.3. Megjegyzések az embriók *in utero* továbbfejlődéséhez

Az *in vitro* megfigyelt jelenséget (a biopsziázott embriók fejlődési lemaradása) *in vivo* körülmények között, *in utero* is vizsgáltuk az embrió-beültetést követően. Feltételeztük, hogy a különböző kezelési csoportokból származó embriók fejlettségi különbsége a vemhesség alatt is megfigyelhető. A vemhesség 9. napján a gasztruláció korai szelvényezettségi állapotában, a 13. Theiler fejlődési fokú (KAUFMAN, 1990) kontroll embriók esetén már megfigyelhető a kifordulás jelensége, amíg a biopsziázott embriókból fejlődő embriók mind nagyságukban, mind fejlettségükben ettől elmaradnak és rájuk a 12. Theiler fejlődési fokozat jellemző. A fejlődési késésben levő magzatok szövettani elemzése során azonban nem találtunk semmilyen rendellenes elváltozást. Az organogenezis során vizsgált 12 és fél napos korban a magzatok között sem fejlettségben, sem méretben nem találtunk már eltérést. Minden magzatot a korának megfelelő, 20. Theiler fejlődési fokúnak találtunk. A vemhesség 19. napján, a születést közvetlenül megelőzően sem tapasztaltunk eltérést a magzatok között.

Véleményem szerint - szemben HSU és mtsai (2000) megállapításaival - a preimplantációs korban végzett mikromanipuláció **az implantáció idején és a korai vemhesség idején** befolyásolja az embriók fejlődését. Az általunk megfigyelt fejlődésbeli elmaradást a rekompaktálódás folyamata, valamint túl korai peteburokból való kibújást megelőző hólyagcsíra expanziónak az elmaradása okozhatja. Eredményeink arra utalnak, hogy a magzatok ezt, a mikromanipuláció előidézte fejlődési késést az organogenezis során, a vemhesség 13. napjára képesek behozni, és a továbbiakban a természetes magzati fejlődésre jellemző módon fejlődnek tovább. Bár egyes közlemények a biopsziázott embriók esetében csökkent mértékű implantációról tudósítanak (WILTON és TROUNSON, 1989), kísérleteinkben csupán a magzati élet korai szakaszában az **embriófejlődés sebességében** tapasztaltunk eltérést a kezelt és a kontroll magzatok fejlődését megfigyelve. Az organogenezis kezdeti stádiumában lezajló kompenzációs jelenség mindenképpen további vizsgálatokat érdemel.

4.3.5.4. A megszülető utódok jellemzése

A mikromanipuláción átesett embriókból megszülető utódokból egészséges, fertilis felnőtt állatok lettek, melyek továbbszaporodásra is képesek voltak. A biopsziázott

embriókból származó utódok vérparamétereinek vizsgálata (CUI és mtsai, 1993), valamint hisztopatológiai analízise (CUI és mtsai, 1994) alapján feltételezhető, hogy a mikromanipuláció nem okoz elváltozást a posztnatális élet során. Megfigyelésünk szerint az embrióbiopsziát követően a megszületett felnőtt egyedek fertilitása, vemhességi ideje, alomlétszáma sem tért el a kontrollhoz képest.

A bemutatott mikromanipulációs eljárás gyors, egyszerű, még a kompaktálódást megkezdő embriók életképességét sem csökkenti, valamint az eltávolított blasztomer sejtmembránját épen hagyja. A mikromanipulációhoz szükséges kapillárisok előállítása könnyű, csupán mikrohuta alkalmazását igényli. A beavatkozáshoz csupán egy, mikrométeres tartományban három dimenzióban mozgó mikromanipulátorra van szükség a drilling kapilláris vezérléséhez, mivel a holder kapillárist a mikromanipulációs szinten rögzítve tartható. (Ez a jellemző a gyakorlati alkalmazás esetén jelenthet előnyt, hiszen a holder kapilláris számára egy egyszerűbb, olcsóbb vezérlő egység beszerzése is elegendő, ha az inverz mikroszkóp mozgatható tárgyasztallal rendelkezik.) A mikromanipuláció során, szemben CHEN és mtsai (1997) módszerével, nem kell biopsziánként a kapillárist AT oldattal újratölteni, így jelentősen megnő a beavatkozás sebessége.

A mikromanipulált embriók *in vitro* a kontrollal megegyező arányban fejlődnek tovább, azonban a sejtmag-számukban való eltérés arra utal, hogy részben az eltávolított blasztomer hiányának, részben a zona pellucidán ejtett nyíláson való idő előtti kibújásnak köszönhetően, elmaradnak a kontrollhoz képest. A vemhesség vizsgálata alapján azonban megállapítható, hogy a magzatok fejlődésbeli lemaradásukat az organogenezis során behozzák. A megszületett utódok normális fenotípussal rendelkeztek.

Kísérleteink lehetőséget teremtettek arra, hogy a preimplantációs korú embriókon végzett mikromanipulációs eljárás hatását vizsgálhassuk a rövid vemhességi idejű egér esetében. Az eljárás élettani hatásainak egérmodellen való vizsgálata elengedhetetlen előfeltétele az embriómanipulációs eljárások gyakorlati bevezetésének. Valószínűsíthető, hogy hasonló következményekkel kell számolni akár emberi, akár haszonállatokon végzett beavatkozások során is.

4.4. Az embrióbiopszia egér és szarvasmarha embriókra gyakorolt, az *in vitro* fejlődés alatt megfigyelt hatásának összehasonlítása.

Az *in vitro* továbbfejlődési adatokból kitűnik, hogy a biopsziázott embriók továbbfejlődési képessége nem tér el lényegesen a kontroll embriókétól egyik faj esetében sem. Az embriók a beavatkozást követően nagyon hasonlóan fejlődtek tovább. A biopsziázott embrióból kialakuló hólyagsírák expanziója mindkét faj esetén elmarad, a blasztocöl folyadék feszítő hatásának eredményeként megkezdődik a trofektoderma sejteknek a peteburok sérülésén keresztül történő kitüremkedése. Kialakul, a szakirodalomban is leírt, ún. 8-as forma (MALTER és COHEN, 1989).

Az egypetűjű ikrek természetes keletkezésének egyik lehetősége, ha egy, a zona pellucidán levő, spontán módon kialakult sérülésen a trofoblaszt sejtekkel együtt kitüremkedő embriócsomó csak részben préselődik keresztül, kialakítva a 8-as formát. A zona pellucida gyakorlatilag elfelezheti az embriócsomót, s ha a peteburkon kívül levő embriórészt leválik, két identikus embrióklón jön létre. Hasonló jelenséget okozhat, ha a zona pellucidán mesterségesen túl szűk nyílást keltünk.

Az egérnél alkalmazott savas emésztés a zona pellucidán kör alakú nyílást hoz létre (57. ábra)



57.ábra: Üres zona pellucidák biopsziázott egérembriók kibújása után

A szarvasmarha embriókon alkalmazott mechanikus penetráció csak egy, 35-40 μm hosszú rést hoz létre a peteburkon.

A hólyagcsírák teljes expansziója egyik esetben sem következik be, hiszen a trofektoderma sejtek a leggyengébb ellenállás irányában átpréselődnek a zona pellucida nyílásán.

Amíg az egér embriók zona pellucidáján létrehozott kör alakú nyílás képes körkörös irányú tágulásra, a szarvasmarha embriók peteburkán kialakított rés azonban csak korlátozottan szélesedik. A zona pellucida így nem képes, a kontroll embriók expanszióját követő kibújásakor megfigyelhető, kb. 70 μm hosszúságban bekövetkező felrepedésre (58. ábra). A felrepedést korlátozhatja a zona pellucida szilárdsága, mert a biopsziázott embriók a zigóta zona pellucidájánál alig vékonyabb zona pellucidája sokkal nagyobb ellenállást fejt ki a blasztocöl nyomásával szemben. A szűk résen keresztül préselődő sejtekből sejtmagnélküli, citoplazmát is alig tartalmazó, sejt membránnal ellátott fragmentumok keletkeznek (59. ábra)



58. ábra: Üres zona pellucida



59. ábra: Sejtfragmentálódás

Feltételezésünk szerint a biopsziázott szarvasmarha embrióknál is megfigyelhető, valódi blasztociszta expanszió helyetti, túl korán bekövetkező sejtkitüremkedés az egérmodellel in utero tapasztalt korai magzatfejlődésbeli lemaradást okozhat. A megfigyelés jelentőségét az adja, hogy a biopszián kívül bármely, részleges zona felnyílást okozó mikromanipuláció, pl. a sejtmag-átültetési klónozás is hasonló hatást eredményezhet.

4.5. Összefoglalás

Kísérleteinkben *in vitro* létrehozott szarvasmarha embriók számára dolgoztam ki egy gyakorlati alkalmazásra is alkalmas mikroaspirációs biopsziás eljárást.

A biopszia embriófejlődésre gyakorolt hatását az embriók *in vitro* továbbtenyésztése során vizsgáltam. Megállapítható, hogy a beavatkozáson átesett embriók továbbfejlődése arányaiban nem tér el a kezeletlen kontroll csoport embrióinak eredményétől, de a fejlődés jellege eltérést mutat. Megfigyelhető a hólyagcsírák méretnövekedésének elmaradása, és a zona pellucidából való kibújás megkezdése a természetes folyamatnál korábban következik be.

Az embrióbiopsziát sikeresen integráltuk az ASMO nukleusztenyésztési rendszerbe, az embrió-előállító technológia embriószexálási folyamata elemeként. A biopsziával elkülönített blasztomereket az ivarmeghatározáson kívül egyéb genetikai vizsgálatokra, pl. nagyértékű gének genotipizálására, terheltségek kimutatására is felhasználhatjuk.

Az eljárás feltételeinek hazai megteremtésével lehetőség nyílt arra, hogy a technológiát hazai, a modern szaporodásbiológiai beavatkozásokat is alkalmazó tenyésztési programok integrálhassák.

Preimplantációs korú embriók biopsziájának a recipiens állatokba ültetést követő, magzati fejlődésre gyakorolt hatását egérmodellen vizsgáltuk. Az egér embriók mikromanipulációjához egy új embrióbiopsziás eljárást dolgoztam ki.

Az embrióbiopsziához kifejlesztett, új, savas emésztéses zona pellucida megnyitást alkalmazó, csupán két mikromanipulátort és mikropapillárist igénylő mikroaspirációs eljárás az eddigi humán terápiában és egérmodellen való kutatásokban elterjedt módszereknél lényegesen egyszerűbb és gyorsabb megoldást kínál.

A mikromanipulációt követően az embriók *in vitro* fejlődését tekintve, akárcsak a szarvasmarha embriók esetében, nem tapasztaltunk a továbbfejlődő embriók arányában eltérést a kontroll csoporthoz képest. Az embriók fejlődésének jellege megegyezett a biopszián átesett szarvasmarha embriókéval, szintén megfigyelhető volt a hólyagcsírák méretnövekedésének elmaradása, és a zona pellucidából való, természetes folyamatnál korábbi kibújás.

A bioszán átesett embriókat recipiens nőtényekbe ültettük, majd a vemhesség három szakaszában (9., 13., 19. nap) bíráltuk el a magzatok fejlettségét. A továbbfejlődő, életképes magzatok aránya a vemhesség egyik szakaszában sem tért el a kontroll csoporthoz képest.

A biopsziázott embriókból fejlődő magzatok a vemhesség 9. napján fél-egy napos fejlődési elmaradást mutattak a kontroll embriókból fejlődő magzatokhoz képest. A vemhesség későbbi szakaszaiban a magzatok fejlődési elmaradása azonban már nem volt megfigyelhető.

A biopszián átesett embriókból származó, megszületett utódokon sem születés utáni fejlődésbeli, sem szaporodásbiológiai elváltozások nem voltak kimutathatók.

5. A DOLGOZAT ÖSSZEFOGLALÁSA

Dolgozatomban 1998 és 2002 között végzett laboratóriumi kísérleteim eredményeiről számoltam be. A kísérletek tervezésekor törekedtem arra, hogy a vizsgált módszerek gyakorlati céloknak is megfeleljenek. Átfogóbb irodalmi áttekintés segítségével kívántam bemutatni, hogy a tanulmányozott az állatbiotechnológiai eljárások milyen szerepet tölthetnek be a modern állattenyésztési rendszerekben.

A dolgozatomban ismertetett, általam legfontosabbnak ítélt eredményeimet a következő pontokban kívánom összegezni:

1. A Mezőgazdasági Biotechnológiai Kutatóközpont Embriológiai Laboratóriumában az elmúlt négy év során sikerült egy olyan *in vitro* szarvasmarha embrió-előállító technológiát kialakítani, amely egyaránt kiszolgálhatja az alapkutatás és a gyakorlat igényeit. A rendszer segítségével, akár *in vivo*, akár postmortem eredetű petesejtekből, a gyakorlat számára beültetésre alkalmas kereskedelmi minőségű embriók állíthatók elő *in vitro*. Emellett a technológia segítségével *ex situ* génmegőrzési célból kialakítandó embrióbank számára is lehet mélyhűtésre alkalmas blasztocisztákat létrehozni. Az eljárást alkalmazó laboratóriumot 2000-ben EU kompatibilis embrió-előállító állomásként (H-3 sz.) regisztrálta az OMMI.
2. A termékenyítőanyag minőségének elbírálásához alkalmazott Kovács-Foote féle festés kiértékelésének megkönnyítése céljából sikerült egy egyszerű, az Internetről ingyenesen letölthető adatbeviteli programot (Hamupipőke/Cinderella hímivarsejt számláló program) kifejleszteni. A DOS és Windows operációs környezetben futtatható változatokkal rendelkező program lehetővé teszi, hogy a megfigyelési adatokat egy, a termékenyítőanyag-bíráló laboratóriumban egyébként is megtalálható számítógép billentyűzetének Num Pad gombjaival lehessen folyamatos mikroszkópos megfigyelés mellett betáplálni.
3. Az *in vitro* termékenyítés felúsztatási eljárása segítségével sikerült közvetve igazolnom, hogy a Kovács-Foote féle fénymikroszkópos festés eredménye szerint élő, ép akroszómájú, de festődő farkú hímivarsejtek csökkent mozgásképeségűek. A motilitás

szempontjából ható szelekciós eljárás ezen hímivarsejtek arányát lényegesen csökkenti a felúsztatás során kialakult, motilis sejteket tartalmazó felülúszóban.

4. Oktatási és ismeretterjesztési célból a spermaértékelés és az *in vitro* embrió-előállítás módszereinek bemutatására két Internetes web site-ot hoztam létre.
5. Az *in vitro* embrió-előállító rendszer segítségével létrehozott embriók beültetés előtti genetikailag jellemezése, a PGD számára mikroaspirációs embrióbiopsziás eljárási protokollt dolgoztam ki. Az eljárást a gyakorlatban is alkalmaztam az ASMO nukleusz tenyésztési rendszerben, nagy értékű embriók szexálása alkalmával. A recipiens állatokba ültetett embriókból két utód született meg.
6. A mikromanipuláció embrió és magzatfejlődésre gyakorolt hatását egérmodellen is tanulmányoztam. Az egérmodell számára, még nem kompaktálódott embriókon megvalósítható, új, egyszerűsített biopsziás eljárást dolgoztam ki. A csupán két mikromanipulátort felhasználó eljárást, egyszerűsége miatt, a humán asszisztált reprodukciós terápia is alkalmazhatja.
7. Az embrió-beültetést követően a biopszián átesett embriókból, magzatok fejlődésének jellegében bekövetkező változásokat megfigyelve megállapítottam, hogy a mikromanipulációs beavatkozásnak az embrió-beültetést követően, csak a vemhesség korai szakaszában, az organogenezist megelőzően tapasztalható lényeges hatása. A mikroaspirációs módszer *in vitro* embriófejlődésre gyakorolt hatását összevetve az egérmodellen tapasztaltakkal megállapítható, hogy a zona pellucida részleges sérülése miatt *in vitro*, szarvasmarha embriók esetében is megfigyelhető az egér embriók esetén kimutatott, zona pellucidából való, túl korán bekövetkező részleges kibújás.

Remélem, hogy az elmúlt évek során végzett kutatómunkám, kísérleti eredményeim, ha szerény mértékben is, de hozzájárulhatnak a magyar szarvasmarha tenyésztés versenyképességének a fenntartásához. Amennyiben lehetőség lesz rá, a jövőben is a gyakorlat számára hasznosítható eredményekkel záruló alkalmazott kutatási területen szeretnék tevékenykedni.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Mindenek előtt köszönöm szüleimnek, kedvesemnek és baráti körömnek a kitartó, folyamatosan biztató támogatást. Szeretném megköszönni mindazok bizalmát és segítségét, akik évek óta ösztönöznek a kísérleteim dolgozat formájában történő összefoglalására.

Köszönöm témavezetőimnek, **Dr. Jávor Andrásnak**, és **Dr. Gócza Elennek** hogy segítették a dolgozat elkészülését. Hálával emlékezem kiváló tanárjaimra, konzulenseimre, **Dr. Dohy János** akadémikusra, aki az utolsó pillanatig atyai gondoskodással és szeretettel támogatta és irányította a kutatómunkámat, és **Dr. Keszthelyi Tiborra**, aki TDK témavezetőm volt. **Dr. Nagy Andrásnak**, első főnökömnek köszönhető, hogy kiváló iskolájában alkalmazott embriológiával kezdtem foglalkozni. Köszönöm **Stohlmayer Ákosnénak** a gimnáziumi biológia órákat, amik nélkül biztosan nem írhatnám ezeket a sorokat. Köszönöm kollégáimnak a kitartó baráti noszogatót, vitákat és a sok közös munkát. Köszönöm **Dr. Szabó Lászlónak**, **Dr. Hiripi Lászlónak**, **Baranyai Bencének** az ismeretségünk első percétől tartó bizalmat és barátságot, **Dr. Kovács Andrásnak** a kiváló Kovács-Foote féle festést, valamint azt hogy ötletrohamainkat barátilag egymásra zúdíthatjuk. Köszönöm volt és jelenlegi munkahelyi vezetőimnek, **Dr. Bősze Zsuzsannának**, **Dr. Solti Lászlónak**, **Dr. Dinnyés Andrásnak**, **Dr. Gócza Elennek**, **Dr. Merja Markkulának**, és **Dr. Asko Maki-Tanilának** a munkában nyújtott iránymutatást és azt, hogy munkacsoportjukban megteremtették kutatómunkám feltételeit. Hálás vagyok munkatársaimnak, **Kobolák Juliannának**, **Gróf Mihálynénak**, **Polgár Zsuzsának** a kísérletek során nyújtott segítségért. Köszönöm **Dr. Nagy Szabolcsnak** és **Somfai Tamásnak**, hogy kedvük volt a közös munkákhoz, és rontották a szemüket a tárgylemezek kiértékelésével. Hálával tartozom **Dr. Bali Papp Ágnesnek**, **Dr. Zomborszky Zoltánnak**, **Dr. Cseh Sándornak**, **Dr. Gábor Györgynek**, **Dr. Macháty Zoltánnak**, **Dr. Alexandr Makarevichnek**, **Dr. Horváth Gabriellának**, **Dr. Veress Iudithnak**, **Laczkó Lászlónak** a sok segítségért. **Fábián Péter**, **Kiss Attila**, **Szabó Miklós**, **Gódor Nóra**, **Madarász Miklós** – nekik köszönhető, hogy az Interneten is lehet olvasni rólunk. Nem felejttem **Gerencsér Ákosnak** a közös cikksorozatunk során tanúsított türelmét. Köszönöm szorgalmas diákjaimnak, **Johanna Markolának**, **Szabari Miklósnak**, **Nánássy Lászlónak**, **Petrovics Ágnesnek**, hogy lehetőséget nyújtanak számomra tanítani tanulni.

6. IRODALOMJEGYZÉK

- AGRAWALA P., WAGNER V., GELDERMANN H. (1992): Sex determination and milk protein genotyping of preimplantation stage bovine embryos using multiplex PCR. *Theriogenology* 38. 969-978. p.
- ANDERSON G. (1985): Manipulation of the mammalian embryo. *J. Anim. Sci.* 61. 1-13. p.
- ANDERSON G. (1987): Identification of embryonic sex by detection of H-Y antigen. *Theriogenology* 27. 81-97. p.
- ÁRNYASI M. (2001): Molekuláris genetikai vizsgálatok a gazdasági állatfajok termelési eredményeinek javítása érdekében. *Acta Agr. Debreceniensis* 1. 92-96. p.
- AUSTIN C. R. (1952): The "capacitation" of the mammalian sperm. *Nature* 170. 326. p.
- BÁRÁNDI ZS., VAJTA G., MACHÁTY Z., VARGA ZS., CSEH S., SOLTI L. (1992): In vitro fertilization as a new tool of preserving the Hungarian Grey cattle. In: *Genetic Conservation of Domestic Livestock. II.* Alderson L, Bodó I, eds. C.A.B. International. Wallingford. 271-274. p.
- BÁRÁNDI ZS, SOLTI L, CSEH S, VARGA ZS, MACHÁTY Z, VAJTA G. (1993): Comparison of the in vitro fertilizing ability of sperm from endangered Hungarian Grey bulls. *Anim. Reprod. Sci.* 31. 13-19. p.
- BARANYAI B., GÓCZA E., BODÓ SZ. (2003): SSV method: a good choice for cryopreserving of biopsied cattle IVP embryos. *Annual Meeting of ESDAR*. Submitted.
- BAVISTER B.D., YANAGIMACHI R. (1977): The effects of sperm extracts and energy sources on the motility and acrosome reaction of hamster spermatozoa in vitro. *Biol. Reprod.* 16. 228-237. p.
- BERG T., HEALY P. J., TOLLERSRUD O. K., NILSSEN O. (1997): Molecular heterogeneity for bovine alpha-mannosidosis: PCR based assays for detection of breed-specific mutations. *Res. Vet. Sci.* 63. 279-282. p.

- BILSTROM J. A., VALBERG S. J., BERNOCO D. MICKELSON J. R. (1998): Genetic test for myophosphorylase deficiency in Charolais cattle. *Am. J. Vet. Res.* 59. 267-270. p.
- BODÓ SZ., DINNYÉS A., BARANYAI B., DOHY J., SOLTI L. (1996): Development to blastocyst stage of parthenogenetically activated bovine oocytes. *J. Physiol. Pharmacol.* 47. 145. p.
- BODÓ SZ., BARANYAI B. (1996): In vitro production of bovine embryos. <http://www.abc.hu/institutes/animal/IVF/AFOTORZS.HTML> (2003. január 25.)
- BODÓ SZ., DINNYÉS A., BARANYAI B., SOLTI L., DOHY J. (1998a): Comparison of different treatments for parthenogenetic activation of bovine oocytes matured in vitro. *Acta Vet. Hung.* 46. 493-500. p.
- BODÓ SZ., FANCSOVITS P., ZANDOKI E., ZANDOKI R., TOBIAS S, ZANDOKI B., BARANYAI B. (1998b): 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.
- BODÓ SZ., NAGY SZ., BARANYAI B., GÓCZA E., KOVÁCS A. (2000a): Bull sperm quality evaluated with differential staining before and after swim up. International Conference of Reproductive Biology (incorporating the 9. French-Czech-Slovak Colloquium)
- BODÓ SZ., NAGY SZ., BARANYAI B., SOMFAI T., GÓCZA E., KOVÁCS A. (2000b): Sperminőség jellemzése swim up előtt és után. *Állattenyésztés és Takarmányozás* 49. 581-583.p.
- BODÓ SZ. (2000c): Jelentés 10 bika spermamintáinak vizsgálatáról. Beszámoló jelentés az OMT Rt. számára.
- BODÓ SZ., BARANYAI B., GÓCZA E., DOHY J., MARKKULA M. (2001): Preimplantation genetic diagnosis in cattle. *Acta Vet. Hung.* 49. 99-109.
- BODÓ SZ., HIRIPI L., BARANYAI B., POLGAR ZS., KOBOLÁK J., SOMFAI T., NAGY SZ., KOVÁCS A., DOHY J., GÓCZA E. (2002a): Genetic, morphologic, and functional qualification and complex evaluation of bull semen. *Scientific Papers of Animal Sciences and Biotechnologies, Timisoara.* 35. 532-536. p.

- BODÓ SZ., GÓDOR N., KISS A., SZABÓ M., NAGY SZ. (2002b): 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.
- BODÓ SZ., HIRIPI L., BARANYAI B., POLGÁR ZS., KOBOLÁK J., SOMFAI T., NAGY SZ., KOVÁCS A., DOHY J., GÓCZA E. (2002c): 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.
- BOLS P.E.J., VANDENHEEDE J.M.M., VAN SOOM A., DE KRUIF A. (1995): Transvaginal ovum pick up (OPU) in the cow: a new disposable needle guidance system. Theriogenology 43. 677-687. p.
- BRACKETT B. G., OH Y. K., EVANS J. F., DONAWICK W. J. (1977): Bovine fertilization and early development in vivo and in vitro. In Proceedings of 10th Ann. Meet. Soc. Study Reprod. Austin TX. 56 p.
- BRACKETT B.G., BOUSQUET D., BOICE M.L., DONAWICK W.J., EVANS J.F., DRESSEL M.A. (1982): Normal development following in vitro fertilization in the cow. Biol. Reprod. 27. 147-158. p.
- BRADBURY M. W., ISOLA L. M., GORDON J. W. (1990): Enzymatic amplification of a Y chromosome repeat in a single blastomere allows identification of the sex of preimplantation mouse embryos. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87. 4053-4057. p.
- BREDBACKA P. (1998): Recent developments in embryo sexing and its field application. Reprod. Nutr. Dev. 38. 605-613.p.
- BREDBACKA P. (2001): Progress on methods of gene detection in preimplantation embryos. Theriogenology 55. 23-34. p.
- BREDBACKA P., KANKAANPÄÄ A., PEIPPO, J. (1995): PCR-sexing of bovine embryos: a simplified protocol. Theriogenology 44. 167-176. p.

- CARBONNEAU G., MORIN N., DUROCHER J., BOUSQUET D. (1997): Viability of bovine IVF embryos biopsied with microsection or microaspiration technique for sexing. *Theriogenology* 47. 266. p.
- CAROLAN C., MONAGHAN P., GALLAHER, M., GORDON I. (1994): Effect of recovery method on yield of bovine oocytes per ovary and their developmental competence after maturation, fertilization and culture in vitro. *Theriogenology* 41. 1061-1068. p.
- CHAN A.W., KUKOLJ G., SKALKA A.M., BREMEL, R.D. (1999): Timing of DNA integration, transgenic mosaicism, and pronuclear microinjection. *Mol. Reprod. Dev.* 52. 406-413. p.
- CHEN S.U., HO H.N., CHEN H.F., CHAO K.H., HUANG S.C., LEE T.Y., YANG Y.S. (1997): A simplified technique for embryo biopsy: use of the same micropipette for zona drilling and blastomere aspiration. *J. Assist. Reprod. Genet.* 14. 157-161. p.
- CHEN S.U., CHAO K.H., WU M.Y., CHEN C.D., HO H.N., YANG Y.S. (1998): The simplified two-pipette technique is more efficient than the conventional three-pipette method for blastomere biopsy in human embryos. *Fertil. Steril.* 69. 569- 575. p.
- CHRENEK P., BOULANGER L., HEYMAN Y., UHRIN P., LAURINCIK J., BULLA J., RENARD J. P. (2001): Sexing and multiple genotype analysis from a single cell of bovine embryo. *Theriogenology* 55. 1071-1081. p.
- CHRISTENSEN L. G., LIBORIUSSEN T. (1986): Embryo transfer in the genetic improvement of dairy cattle. In: *Exploiting new technologies in animal breeding* (ed. SMITH C., KING J.W.B., MCKAY J.C.) Oxford Univ Press, Oxford, GB. 37. p.
- CHRISTIENSEN L. G. (1997) MOET (Többszörös Ovuláció és Embrióátültetés = Multiple Ovulation and Embryo Transfer) szempontjai a tejelőmarha-tenyésztésben. VIII. Holstein-fríz Genetikai Világkongresszus, Budapest, Összefoglaló, 91-99.p.
- COLLEAU J.J. (1985): Genetic improvement by embryo transfer within an open selection nucleus in dairy cattle. In *Proc. 3rd World Congress Genet. Appl. Livest. Prod. Lincoln 1986, NE, USA* 12. 127. p.

- COTINOT C., KIRSZENBAUM M., LEONARD M., GIANQUINTO L. VAIMAN M. (1991): Isolation of bovine Y-derived sequence: potential use in embryo sexing. *Genomics* 10. 646-653. p.
- CRITSER E.S. ÉS FIRST N.L. (1986): Use of a fluorescent stain for visualization of nuclear material in living oocytes and early embryos. *Stain. Technol.* 61. 1-5. p.
- CUI K.H., PANNALL P., CATES G., MATTHEWS C. D. (1993): Blood analysis of mice born following single-cell embryo biopsy. *Hum. Reprod.* 8. 1906-1909. p.
- CUI K.H., BARUA R., MATTHEWS C.D. (1994): Histopathological analysis of mice born following single cell embryo biopsy. *Hum. Reprod.* 9. 1146 - 1152. p.
- DEKKERS J. C. M., SHOOK, G. E. (1990): Economic evaluation of alternative breeding programs for commercial artificial insemination firms. *J. Dairy Sci.* 73. 1902-1937. p.
- DINNYÉS A., BODÓ SZ., SOLTI L. (1997): Production of cloned hatched blastocysts from in vitro produced bovine morulae in Hungary, *Proc. 8th European Congress on Biotechnology*, 17-21 Aug, 1997, Budapest, No. MO6208.
- DINNYÉS A., BODÓ SZ., BARANYAI B. (1998): Nuclear content of fragments obtained by centrifugation of matured bovine oocytes, *Theriogenology* 49. 320. p.
- DOHY J. (1985) Új biotechnológiai eljárásoktól várható fejlődés a magyar állattenyésztésben. *Magyar Állatorvosok Lapja* 40. 71-72. p.
- DOHY J. (1999): *Genetika állattenyésztőknek*. Mezőgazda Kiadó, Budapest
- DUMOULIN J.C., BRAS M., COONEN E., DREESEN J., GERAEDTS J.P., EVERS J.L. (1998): Effect of Ca²⁺/Mg²⁺-free medium on the biopsy procedure for preimplantation genetic diagnosis and further development of human embryos. *Hum. Reprod.* 13. 2880-2883. p.
- DOWNS S.M. (1993): Factors affecting the resumption of meiotic maturation in mammalian oocytes. *Theriogenology* 39. 65-79. p.
- DÜRR J.W. (2000): Use of MOET nucleus breeding schemes in dairy cattle. <http://animsci.agrenv.mcgill.ca/servers/anbreed/nucleus/abs.htm> (2003.január 25.)
- FANCSOVITS P., BARANYAI B., BODÓ SZ., DINNYÉS A., DOHY J. (1998): Comparison of defined embryo culture systems in cattle, *Theriogenology* 49. 199. p.

- FIRST N.L, PARRISH J.J. (1987): In vitro fertilization in ruminants. J. Reprod. Fert. Suppl. 34. 151-165. p.
- FEKETE GYOR L. (2001): A magyar tejtermelés és tejipar (ágazati elemzés). Central European Banker Online. www.mkb.hu/letoltes/ceb/2001/tejiparceb.PDF
- FÉSÜS, L. (1997): Marker assisted selection in livestock. 1st paper: theoretical aspects. Állattenyésztés és Takarmányozás 46. 289-192.
- FUKUDA Y, ICHIKAWA M, NAITO K, TOYODA Y. (1990): Birth of normal calves resulting from bovine oocytes matured, fertilized and cultured with cumulus cells in vitro up to the blastocyst stage. Biol. Reprod. 42. 114-119. p.
- GALLI C., CROTTI G., NOTARI C., TURINI P., DUCHI R., LAZZARI G. (2001): Embryo production by ovum pick up from live donors. Theriogenology 55. 1341-1357 p.
- GALLI C., DUCHI R., CROTTI G., TURINI P., PONDERATO N., COLLEONI S., LAGUTINA I., LAZZARI G. (2003): Bovine embryo technologies. Theriogenology 59. 599-616. p.
- GÁSPÁR M. (1999): A haszonállatok szaporításának korszerű módszerei az Európai Unióban. Mezőgazdaságunk útja az Európai Unióba sorozat 12. füzet OMGK, Budapest
- GORDON, I. (1994): Laboratory production of cattle embryos. Biotechnology in Agriculture Vol II. CAB International
- GORDON J.W., GANG I. (1990): Use of zona drilling for safe and effective biopsy of murine oocytes and embryos. Biol. Reprod. 42. 869-876. p.
- GOTO K, KAJIHARA Y, KOSAKA S, KOBAYASHI M, NAKANISHI Y, OGAWA K. (1988): Pregnancies after coculture of cumulus cells with bovine embryos derived from in vitro fertilization of in vitro matured follicular oocytes. J. Reprod. Fert. 83. 753-758. p.
- HANDYSIDE A. H., PATTINSON J. K., PENKETH R. J., DELHANTY J. D., WINSTON R. M., TUDDENHAM E. G. (1989): Biopsy of human preimplantation embryos and sexing by DNA amplification. Lancet 1. 347-349. p.
- HANDYSIDE A. H., DELHANTY, J. D. (1997): Preimplantation genetic diagnosis: strategies and surprises. Trends Genet. 13. 270-275. p.

- HARASZTI J., ZÖLDÁG L. (1993): A háziállatok szülészete és szaporodásbiológiája. Mezőgazda Kiadó Budapest
- HARPER K. M., BRACKETT B. J. (1991): Effect of gonadotrophins with epidermal growthfactor (EGF) during maturation on embryo viability in vitro. Biol. Reprod. 44. 85. 132. p.
- HARPER P. A., HEALY P. J., DENNIS J. A., O'BRIEN J. J. RAYWARD D. H. (1986): Citrullinaemia as a cause of neurological disease in neonatal Friesian calves. Aust. Vet. J. 63. 378-379. p.
- HASLER J. F., MCCAULEY A. D., LANTHROP W. F. FOOTE R. H. (1987) Effect of donor-embryo-recipient interactions on pregnancy rate in a large-scale bovine embryo transfer program. Theriogenology 27. 139-168.
- HASLER J. F., HENDERSON W. B., HURTGEN P. J., JIM Z. Q., MCCAULEY A. D., MOWER S. A. NEELY B., SHUEY L. S., STOKES J. E., TRIMMER S. A. (1995): Production, freezing and transfer of bovine IVF embryos and subsequent calving results. Theriogenology 43. 141-152. p.
- HEYMAN Y. (1999): Overall bovine embryo transfer activity in Europe in 1998. Proceedings of the 15th Scientific Meeting European Embryo Transfer Association Lyon, France, 10-11 Sept. 52. 25-69. p.
- HERR C., HOLT N., MATTHAEI K., REED, K. (1990): Sex of progeny from bovine embryos sexed with a rapid Y-chromosome detection assay. Theriogenology 33. 247. p.
- HOCHMAN D., ZARON Y., DEKEL I., FELDMESSER E., MEDRANO J., SHANI, M., RON, M. (1996): Multiple genotype analysis and sexing of IVF bovine embryos. Theriogenology 46. 1063-1075. p.
- HOGAN B., BEDDINGTON R., CONSTANTINI F., LACY E. (1994): Manipulating of mouse embryo. Second edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York
- HOLM P., BOOTH P. J., SCHMIDT M. H., GREVE T., CALLESEN H. (1999): High bovine blastocyst development in a static in vitro production system using SOFaa medium supplemented with sodium citrate and myo-inositol with or without serum-proteins. Theriogenology 52. 638-700. p.

- HORVAT S., MEDRANO J. F., BEHBOODI E., ANDERSON G. B., MURRAY J. D. (1993): Sexing and detection of gene construct in microinjected bovine blastocysts using the polymerase chain reaction. *Transgenic Res* 2. 134-140. p.
- HUNTER R. H. F. (1993): Sperm:egg ratios and putative molecular signals to modulate gamete interactions in polytocous mammals. *Mol. Reprod. Dev.* 35. 324-327. p.
- HSU M.I., BARROSO G., MAYER J., LANZENDORF S., GIBBONS W.E., MUASHER S., OEHNINGER S. (2000): Is the timing of implantation affected by zona pellucida micromanipulation? *J. Assist. Reprod. Genet.* 17. 34-38. p.
- HYTTINEN J.M., PEURA, T. TOLVANEN, M. AALTO, J. ALHONEN, L. SINERVIRTA, R., HALMEKYTÖ M., MYÖHÄNEN S. JÄNNE J. (1994): Generation of transgenic dairy cattle from transgene-analyzed and sexed embryos produced in vitro. *Biotechnology (N Y)* 12. 606-608. p.
- HYTTINEN J. M., PEURA T., TOLVANEN M., AALTO J., JÄNNE J. (1996): Detection of microinjected genes in bovine preimplantation embryos with combined DNA digestion and polymerase chain reaction. *Mol. Reprod. Dev.* 43. 150-157. p.
- IRITANI A., NIWA K. (1977): Capacitation of bull spermatozoa and fertilization in vitro of cattle follicular oocytes matured in culture. *J. Reprod. Fert.* 50. 119-121. p.
- JÁNOSA Á., BARANYAI B., DOHY J. (1999): Comparison of milk production of the progeny of BLAD-carrier and healthy Holstein bulls in Hungary. *Acta. Vet. Hung.* 47. 291–302. p.
- JÁVOR A. (1999) A magyar állattenyésztés súlya és belső arányai. Tiszántúli Mezőgazdasági Tudományos Napok '99 DATE, 1999. október 28-29. <http://www.date.hu/kiadvany/tessedik/2/javor.pdf> (2003. január 25.)
- JONES J.M., FIRST. N.L. (1990): Effect of transcriptional inhibition on bovine embryo development. *Biol. Reprod.* 42. 57. p.
- JÖRGENSEN C.B., AGERHOLM J.S., PEDERSEN J., THOMSEN P.D. (1993): Bovine leukocyte adhesion deficiency in Danish Holstein-Friesian cattle. I. PCR screening and allele frequency estimation. *Acta. Vet. Scand.* 34. 231-236. p.
- JUGA J. (2002): Joint Nordic Genetic Evaluation of dairy cattle. *Vet. Zootechnika* 19. 52-55. p.

- KALM E. (2001): Development of dairy cattle breeding strategies in Europe. In Proceedings of 52th Annual Meeting of Animal Production, Budapest. 26th August 2001 GC 6.1. 1-8. p.,. http://www.eaap.org/rond_ta.htm (2003. január 25.).
- KAUFMAN M.H. (1990): Morphological stages of postimplantational embryonic development. In: Postimplantational Mammalian Embryos. A Practical Approach. Edited by Copp, A. J. and Cockroft, D. L. Oxford University, Oxford Press, 81-91. p.
- KAUFMAN M.H. (1992): The atlas of mouse development. Academic press limited, London, pp 47-67.; 145-175. p.
- KOVÁCS A., FOOTE R.H. (1992): Viability and acrosome staining of bull, boar and rabbit spermatozoa. Biot. Histoc. 67. 119 –124. p.
- KRZYMINSKA U.B., LUTJEN J., O'NEILL C. (1990): Assessment of the viability and pregnancy potential of mouse embryos biopsied at different preimplantation stages of development. Hum. Reprod. 5. 203-208. p.
- LOHUIS M.M. (1997): Modern dairy breeding. Presentation. <http://www.aps.uoguelph.ca/~lohuism/modddairy> (2003. január 25.)
- LOHUIS M.M. (1998): Establishment and use of nucleus herd schemes for genetic improvement of dairy cattle. Presented at Congres CAAB/CETA Convention. Saint-Hyacinthe, Quebec. August 30-September 2. <http://www.aps.uoguelph.ca/~lohuism/CAAB/> (2003. január 25.)
- LU K.H., GORDON I. (1987): Effect of serum, hormones and cumulus cells on the in vitro maturation of bovine oocytes. In Proceedings of the Soc. Study on Fertility. York-1987. 81.p.
- MACHÁTY Z., PÁLDI A., CSÁKI T., VARGA Z., KISS I., BÁRÁNDI Z. VAJTA G. (1993): Biopsy and sex determination by PCR of IVF bovine embryos. J. Reprod. Fertil. 98. 467-470. p.
- MADISON V., AVERY B., GREVE T. (1991): Effect of sperm concentration on in vitro penetration and development of bovine oocytes. J. Anim. Sci. 69. 461. p.
- MALTER, H.E., COHEN, J. (1989): Blastocyst formation and hatching in vitro following zona drilling of mouse and human embryos. Gamete Res. 24. 67-80. p.

- MEINTJENS M., BELLOW M.S., BROUSSARD J.R., PAUL J.B. GODKE R.A. (1993): Transvaginal aspiration of bovine oocytes from hormone treated pregnant beef cattle for IVF. *Theriogenology* 39. 266 p.
- MERMILLOD P., MASSIP A., DESSY F. (1992): In vitro production of cattle embryos: review and Belgian results. *Int. J. Dev. Biol.* 36. 185-195. p.
- MULLIS K., FALOONA F. A. (1987): Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol.* 155. 335. p.
- MUNNÉ S., TANG Y.X., GRIFO J., ROSENWAK, Z., COHEN J. (1994): Sex determination of human embryos using the polymerase chain reaction and confirmation by fluorescence in situ hybridization. *Fertil. Steril.* 61. 111-117. p.
- NAGY SZ., HÁZAS G., BALI PAPP Á., IVÁNCICS J., SZÁSZ F., SZÁSZ F. JR., KOVÁCS A., FOOTE R.H. (1999): Evaluation of sperm tail membrane integrity by light microscopy. *Theriogenology* 52, 1153 –1159.p.
- NÁNÁSSY L., SZABARI M., SZABÓ L., BARANYAI B., PETROVICS Á., KOVÁCS A., BALI PAPP Á., GÓCZA E., BODÓ SZ. (2003): Spermaértékelés Mikro Swim up eljárás segítségével. *Állattenyésztés és Takarmányozás – megjelenés alatt*
- NICHOLAS F.W., SMITH C. (1983): Increased rates of genetic change in dairy cattle by embryo transfer and splitting. *Anim. Prod.* 36. 341-353. p.
- OZIL, J. P., HEYMAN, Y., RENARD, J. P. (1982): Production of monozygotic twins by micromanipulation and cervical transfer in the cow. *Vet. Rec.* 110. 126-127. p.
- PARRISH J.J., SUSKO-PARRISH J., FIRST N.L. (1984): Effect of swim up separation and heparin pretreatment of frozen-thawed spermatozoa on in vitro fertilization of bovine oocytes. *Biol. Reprod.* 30. 112. p.
- PARRISH J.J., SUSKO-PARRISH J., LEIBFRIED-RUTLEDGE M.L., CRITSER E.S., EYESTONE W.H., FIRST N.L. (1986): Bovine in vitro fertilization with frozen-thawed semen. *Theriogenology* 25. 591-600. p.
- PENKETH R.J., DELHANTY, J.D. VAN DEN BERGHE J.A., FINKLESTONE, E.M., HANDYSIDE A.H., MALCOLM S., WINSTON R.M. (1989): Rapid sexing

- of human embryos by non-radioactive in situ hybridization: potential for preimplantation diagnosis of X-linked disorders. *Prenat. Diagn.* 9. 489-499. p.
- PEURA T., HYTTINEN J.M., TURUNEN M., JÄNNE J. (1991): A reliable sex determination assay for bovine preimplantation embryos using the polymerase chain reaction. *Theriogenology* 35. 547-555. p.
 - PETYIM S., BAGE R., HALLAP T., BERGQUIST A.S., RORIGUEZ-MARTINEZ, LARSSON B. (2003): Two different schemes of twice-weekly ovum pick-up in dairy heifers: effect on oocyte recovery and ovarian function. *Theriogenology* 1-14. p.
 - PICARD L., KING W.A., BETTERIDGE K.J. (1985): Production of sexed calves from frozen-thawed embryos. *Vet. Rec.* 117. 603-608. p.
 - PINCUS G., ENZMANN E.V. (1935): The comparative behavior of mammalian eggs in vivo and in vitro. *J. Exp. Zool.* 62. 665-675. p.
 - PRESICCE G. A., JIANG S., SINKIN M., YANG X. (1993): Oocyte quality and embryo development in prepubertal calves. *Biol. Reprod.* 52. 127 p.
 - ROBERTSON A., RENDEL J.M. (1950): The use of progeny testing with artificial insemination in dairy cattle. *J. Genetics* 50. 21 p.
 - ROBINSON, J. L., SHANKS, R. D. (1993): Low Incidence of Citrullinemia in U.S. Dairy Cattle. *Dairy Cattle Genetics and Selection Collection: Gen. Impr. U.S. National Dairy Database* <http://www.inform.umd.edu/EdRes/Topic/AgrEnv/ndd> (2003. január 25.)
 - RODRIGUEZ-MARTINEZ H., LARSSON B., ZHANG B.R., SÖDERQUIST L. (1996): Assesment of bull sperm fertilizing ability. *Reprod. Dom. Anim.* 31. 515-517. p.
 - ROSENKRANS C.F. JR, FIRST N.L. (1991): Culture of bovine zygotes to the blastocyst stage. Effects of amino acids and vitamins. *Theriogenology* 35. 266. p.
 - ROSENKRANS C.F., ZENG G.Q., MCNAMARA G.T, SCHOFF P.K., FIRST N.L. (1993): Development of bovine embryos in vitro as affected by energy substrates. *Biol. Reprod.* 49. 459-462. p.

- SANTALO J., GROSSMANN M., EGOZCUE J. (1996): Does $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -free medium have an effect on the survival of the preimplantation mouse embryo after biopsy? *Hum. Reprod. Update* 2. 257-261. p.
- SCHELLANDER K., MAYR B., ERTL K., PELI, J. (1993): Simultaneous genotyping of sex and kappa-casein of bovine in vitro fertilized embryos by the PCR technique. *Zentralbl Veterinarmed [A]* 40. 307-309. p.
- SCHWENGER B., TAMMEN I., AURICH, C. (1994): Detection of the homozygous recessive genotype for deficiency of uridine monophosphate synthase by DNA typing among bovine embryos produced in vitro. *J. Reprod. Fertil.* 100. 511-514. p.
- SCHWERIN M., PARKANYI V., ROSCHLAU W., KANITZ W., BROCKMANN G. (1994): Simultaneous loci in bovine embryos by multiplex polymerase chain reaction. *Anim. Biotech.* 5. 47-63. p.
- SEIKE N., UTAKA K., KANAGAWA H. (1990): Production and development of calves from sexed-bisected bovine embryos. *Jpn. J. Vet. Res.* 38. 1-9. p.
- SEMPLE E., LOSKUTOFF N., LEIBO S.P. BETTERIDGE K. J. (1993): Effects of culture medium and maturation time on in-vitro development of bovine oocytes into blastocysts. *Theriogenology* 39. 307. p.
- SHANKS R.D., ROBINSON J.L. (1993): Five Years of DUMPS Testing. *Dairy Cattle Genetics and Selection Collection: Gen. Impr. U.S. National Dairy Database* <http://www.inform.umd.edu/EdRes/Topic/AgrEnv/ndd> (2003. január 25.)
- SOMFAI T., BODÓ SZ., NAGY SZ., BALI PAPP Á., IVÁNCICS J., BARANYAI B., GÓCZA E., KOVÁCS A. (2002): Effect of swim up and Percoll treatment on viability and acrosome integrity of frozen/thawed bull spermatozoa. *Reprod. Domest. Anim.* 37. 285-290. p.
- SOMMERFELD V., NIEMANN H. (1999): Cryopreservation of bovine in vitro produced embryos using ethylen glycol in controlled freezing or vitrification. *Cryobiology* 38. 95-105. p.
- STEPTOE P.C., EDWARDS R.G. (1978) Birth after the reimplantation of a human embryo. *Lancet* 2. 366 p.

- SZABARI M., NÁNÁSSY L., SZABÓ L., BARANYAI B., PETROVICS Á., KOVÁCS A., ZOMBORSZKY Z., GÓCZA E., BODÓ SZ. (2003): Spermaértékelés Peteburok Kötődési Teszt segítségével Állattenyésztés és Takarmányozás – megjelenés alatt
- SZŰCS I. (2001): A szarvasmarha ágazat gazdasági kérdései. Előadás. <http://helios.date.hu/~nabradi/szarvasmarha.ppt> (2003.január 25.).
- TANEJA M., YANG X. (1998): Promises and problems of in vitro production of embryos by TVOR-IVF scheme in cows and heifer. Em. Trans. Newsletter 16. 10-12. p.
- TATENO H., MIKAMO K. (1987): A chromosomal method to distinguish between X- and Y bearing spermatozoa of the bull in zona-free hamster ova. J. Reprod. Fertil. 81. 119-125. p.
- THOMSEN P.D., NIELSEN J.S. (1991): PCR screening for carriers of hereditary citrullinaemia in Danish Holstein-Friesian bulls. Acta. Vet. Scand. 32, 279-282. p.
- VAJTA G., BÁRÁNDI ZS., VARGA ZS., MACHÁTY Z., CSEH S., SZÁSZ F., SOLTI L. (1991): Vemhesség in vitro fertilizált szarvasmarha petesejtéből. Magyar Állatorvosok Lapja 46. 87-90. p.
- VAJTA G., MACHÁTY Z., BÁRÁNDI ZS., VARGA ZS. (1992): Embryos derived from in vitro fertilization of oocytes of pregnant cows. Theriogenology 37. 811-816. p.
- VAJTA G., SOLTI L. (1992): In vitro fertilizáció: új eljárás a szarvasmarhatenyésztésben. Állattenyésztés és Takarmányozás 41. 49-56. p.
- VAJTA G., HOLM P., GREVE T., CALLESEN H. (1997): Comparison of two manipulation methods to produce in vitro fertilized, biopsied and vitrified bovine embryos. Theriogenology 47. 501-509. p.
- VAN ARENDONK J.A.M., LIINAMO A.E. (2003): Dairy cattle production in Europe. Theriogenology 59. 563-569. p.
- VAN BLERK M., NIJS M., VAN STEIRTEGHEM A.C. (1991): Decompaction and biopsy of late mouse morulae: assessment of in-vitro and in-vivo developmental potential. Hum. Reprod. 6. 1298-1304. p.

- VAN SOOM A., VAN VLAENDEREN I., MAHMOUDYADEH A.R., DELUYKER H., DE KRUIF A. (1992): Compaction rate of in vitro fertilized bovine embryos related to the interval from insemination to first cleavage. *Theriogenology* 38. 905-919. p.
- VAN WAGTENDONK – DE LEEUW, MULLAART E., DE ROOS A.P.W., MERTON J.S., DEN DAAS J:H:G., KEMP B., DE RUIGH L. (2000): Effects of different reproduction techniques: AI, MOET or IVP, on health and welfare of bovine offspring. *Therigenology* 53. 575-597. p.
- VERLINSKY Y., RECHITSKY S., VERLINSKY O., MASCIANGELO C., LEDERER K., KULIEV A. (2002): Preimplantation diagnosis for early-onset Alzheimer disease caused by V717L mutation. *J Am Med Assoc* 287. 1018-1021. p.
- VOSBERG, H.P. (1989): The polymerase chain reaction: an improved method for the analysis of nucleic acids. *Hum. Genet.* 83. 1-15. p.
- WACHTEL S., NAKAMURA D., WACHTEL G., FELTON W., KENT M., JASWANEY, V. (1988): Sex selection with monoclonal H-Y antibody. *Fertil. Steril.* 50. 355-360. p.
- WILLADSEN S. M. (1979): A method for culture of micromanipulated sheep embryos and its use to produce monozygotic twins. *Nature* 277. 298-300. p.
- WILLADSEN S. M., POLGE C.(1983): Attempts to produce monozygotic quadruplets in cattle by blastomere separation. *Vet. Rec.* 108. 21-213. p.
- WILLETT E. L., BLACK W. G., CASIDA L. E., STONE W. H., BUCKER P. J. (1951): Successful transplantation of a fertilized bovine ovum. *Science* 113. 247 p.
- WILTON, L. J., TROUNSON, A. O. (1989): Biopsy of preimplantation mouse embryos: development of micromanipulated embryos and proliferation of single blastomeres in vitro. *Biol. Reprod.* 40. 145-152. p.
- WONG C., DOWLING C. E., SAIKI R. K., HIGUCHI R. G., ERLICH H. A., KAZAZIAN H. H. J. (1987): Characterization of beta-thalassaemia mutations using direct genomic sequencing of amplified single copy DNA. *Nature* 330. 384-386. p.
- YADAV B. R., KING W. A., XU K. P., PICARD L., BETTRIDGE K. J. (1990): Sex ratio of bovine embryos produced by fertilization in vivo and in vitro. *Theriogenology* 33. 356. p.

- ZHANG B. R., LARSSON B., LUNDHEIM N., HAARD M. G. H., RODRIGUEZ-MARTINEZ H. (1999): Prediction of bull fertility by combined in vitro assessments of frozen-thawed semen from young dairy bulls entering an AI-programme. *Int. J. Androl.* 22. 253-260. p.
- ZSOLNAI A., FÉSÜS L. (1996): Simultaneous analysis of bovine kappa-casein and BLAD alleles by multiplex PCR followed by parallel digestion with two restriction enzymes. *Anim. Genet.* 27. 207-209. p.
- ZSOLNAI A., FÉSÜS L. (1997): Enhancement of PCR-RFLP typing of bovine leukocyte adhesion deficiency. *Biotechniques* 23. 380-382. p.

MELLÉKLETEK

Rövidítések jegyzéke

EM:	Embriómosás
ET:	Embriótranszfer, embrióbeültetés
FCS:	Fetal calf serum
ITV:	Ivadék teljesítmény vizsgálat
IVM:	In vitro maturáció – Petesejtek in vitro érlelése
IVF:	In vitro fertilizáció – In vitro termékenyítés
IVC:	In vitro culture – Embriók in vitro tenyésztése
IVP:	In vitro embryo production – In vitro embrió előállítás
MOET:	Multiple ovulation and embryo transfer – Petesejt sokszorozásra és embrió- átültetésre alapozott tenyésztési rendszer
MT:	Mesterséges termékenyítés
OPU:	Ovum pick up – Petesejt kinyerés élő állatokból transzvaginális ultrahang segítségével
PGD:	Preimplantációs genetikai diagnózis
STV:	Saját teljesítmény vizsgálat
SZO:	Szuperovuláció

A dolgozat témakörében megjelent saját 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.
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) Book of abstracts* 14. p.
9. **BODÓ, SZ.**, FANCSOVITS, 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., FANCSOVITS P., ZÁNDOKI E., ZÁNDOKI R., TÓBIÁS S., ZÁNDOKI B., **BODÓ SZ.** (1998): A swim-up módszer hatása felolvasztott bikaspermák motilitására, és ezek in vitro termékenyítési tesztje. XIV.Állatbiotechnológiai Kerekasztal Hódmezővásárhely FLOPPYNFO, 014, ISSN: 1215-4407
12. **BODÓ, SZ.**, BARANYAI, B., FANCSOVITS, P., HIRIPI, L., GÓCZA, E.(1998): Preimplantációs korú embriókból származó sejtek, petesejtek PCR analízise. XIV.Állatbiotechnológiai Kerekasztal Hódmezővásárhely FLOPPYNFO, 014, ISSN: 1215-4407
13. **BODÓ SZ.** (2002): A preimplantációs genetikai diagnosztika állatbiotechnológiai alkalmazása. Előadás Modellkísérletek. Embriológus Klub, Budapest
14. **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
15. **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
16. **BODÓ SZ.**, GÓCZA E., BARANYAI B., KOBOLÁK J., DOHY J. (2001): Az alkalmazott embriológia a szarvasmarhatenyésztés szolgálatában. Előadás. XXVII. Akadémiai beszámoló Genetika szekció, Budapest
17. **BODÓ SZ.**, HIRIPI L.: IVF + PGD (1998): A Preimplantációs Genetikai Diagnózis lehetősége az in vitro szarvasmarha-embrió előállítás során. Előadás. XIV.Állatbiotechnológiai Kerekasztal Hódmezővásárhely

18. **BODÓ, SZ.** (1996): Állat-biotechnológiai konferenciák előadásai az interneten..
Előadás, XII.Állat-biotechnológiai Kerekasztal Sárvár és Bécs
19. **BODÓ, SZ., SZABÓ L.** (1995): WWW + IVF Előadás. MBK Napok, Gödöllő
20. **BODÓ SZ., BARANYAI B.** (1996): In vitro production of bovine embryos..
<http://www.abc.hu/institutes/animal/IVF/AFOTORZS.HTML>
21. **BODÓ SZ., SZABÓ L, FÁBIÁN P.** (1995): IVM-IVF-IVC PROGRAM. Internetes metodikai leírás. [http:// www.abc.hu/institutes/animal/IVF/fotorzs.html](http://www.abc.hu/institutes/animal/IVF/fotorzs.html)
22. **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/>

NYILATKOZATOK

NYILATKOZAT

Ezen értekezést a Debreceni Egyetem Agrártudományi Centrum Mezőgazdaságtudományi Karán az Állattenyésztési Tudományok Doktori Iskola keretében készítettem a Debreceni Egyetem ATC MTK doktori (PhD) fokozatának elnyerése céljából.

Debrecen, 2003. március 25.

.....
Bodó Szilárd

NYILATKOZAT

Tanúsítjuk, hogy Bodó Szilárd doktorjelölt 2003-ban a fent megnevezett Doktori Iskola keretében irányításunkkal végezte munkáját. Az értekezésben foglalt eredményekhez a jelölt önálló alkotó tevékenységével meghatározóan hozzájárult, az értekezés a jelölt önálló munkája. Az értekezés elfogadását javasoljuk.

Egyben igazoljuk, hogy nevezett bemutatta Dr. Kovács András, Dr. Gócza Elen, Dr. Nagy Szabolcs és Baranyai Bence társszerzők nyilatkozatát, melyben aláírásukkal elismerik, hogy a doktori értekezés tézisében megfogalmazott megállapításokat és új tudományos eredményeket a jelölt önálló, saját eredményeként ismerik el.

Debrecen, 2003. március 25.

.....
Dr. Jávor András CSc
Témavezető

.....
Dr. Gócza Elen PhD
Témavezető