

**NYUGAT-MAGYARORSZÁGI EGYETEM**  
**MEZŐGAZDASÁGTUDOMÁNYI KAR**  
**MOSONMAGYARÓVÁR**  
**ÁLLATTENYÉSZTÉSI INTÉZET**  
**ÁLLATGENETIKA TANSZÉK**

**Programvezető és témavezető:**

**DR. DR. h.c. IVÁNCICS JÁNOS**  
a mezőgazdasági tudományok doktora

**KÍSÉRLETEK SERTÉS PETESEJTEK IN VITRO**  
**MATURÁLTATÁSÁRA, FERTILIZÁCIÓJÁRA ÉS SERTÉS EMBRIÓK**  
**IN VITRO TENYÉSZTÉSÉRE**

**Készítette:**

**BALI PAPP ÁGNES**

**MOSONMAGYARÓVÁR**

**2000**

# TARTALOMJEGYZÉK

BEVEZETÉS	5
IRODALMI ÁTTEKINTÉS	8
I. A petefészek	8
1. A petefészek kialakulása és fejlődése	7
2. A petefészek funkciói	9
2. 1. Női gaméták termelése	9
2. 2. Hormontermelés és hormonális szabályozás	14
II. A petesejt	22
1. A petesejt növekedése és fejlődése	22
2. A sikeres fertilizáció feltételei	23
3. A spermium egyesülése a petesejttel	26
III. Emlős embriók fejlődése	27
1. Osztódás morula állapotig	27
2. Blastocysta állapot, hatching, elongáció	28
IV. Embriótenyésztés	29
1. Az embriótenyésztés története	29
2. Sertés petesejtek in vitro maturációja	31
3. Sertés petesejtek in vitro fertilizációja	35
4. In vitro embriófejlődés	36
V. A sertés embrió in vitro tenyésztés jelentősége	38
ANYAG ÉS MÓDSZER	40
1. A vizsgálatok helyszíne és ideje	40
2. A laboratórium műszerezettsége	40
2. 1. Széndioxid termosztát	40
2. 2. Mikroszkóp	40
3. A kísérletekhez alkalmazott táptalajok	41
3. 1. A maturáltatáshoz alkalmazott táptalajok	41
3. 2. Az in vitro fertilizációhoz alkalmazott táptalajok összetétele	41
3. 3. Az embriótenyésztés közege	41
4. A petesejtek maturáltatása	43
4. 1. A petesejtek nyerése, maturációs körülmények	43
4. 2. A petesejtek ellenőrzése cumulus sejtek expansiója alapján	44
4. 3. A tüszőfolyadék nyerése és tárolása	44
4. 4. A sejtosztódás fázisainak megállapítása	44
5. A petesejtek in vitro fertilizációja	45
5. 1. A mélyhűtött kansperma előkészítése in vitro termékenyítéshez	45
5. 2. A kansperma életképességének vizsgálata	45

5. 3. Az in vitro fertilizáció körülményei	47
5. 4. Petevezető egyrétegű sejtenyésztés készítése	47
5. 5. A zigóták ellenőrzése	48
6. In vitro embriótenyésztés	49
7. Statisztikai értékelés	49
<b>EREDMÉNYEK ÉS MEGBESZÉLÉS</b>	50
1. A meiózis újraindulása különböző in vitro maturációs közegekben	50
2. Különböző spermium koncentrációk hatása a fertilizációra	56
3. Különböző tápközegekben történő maturáltatás hatása a fertilizációra	59
4. In vitro fertilizáció különböző kanok spermájával	65
5. Különböző in vitro fertilizációs közegek összehasonlítása	68
6. In vitro fertilizáció alatti kokultiválás	70
7. Különböző növekedési faktorokkal történő maturáltatás hatása az embriók fejlődésére	73
8. A maturáltatás alatti kokultiválás FSP-vel, összehasonlítva az EGF kiegészítéssel	81
<b>KÖVETKEZTETÉSEK</b>	84
<b>ÚJ KUTATÁSI EREDMÉNYEK</b>	86
<b>JAVASLATOK</b>	87
<b>ÖSSZEFOGLALÁS</b>	88
<b>SUMMARY</b>	93
<b>IRODALOMJEGYZÉK</b>	98
<b>KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS</b>	114

## BEVEZETÉS

Napjainkban, vagyis az ezredfordulón a biológiai, és ehhez szorosan kapcsolódva a biotechnológiai kutatások ugrásszerű fejlődésének lehetünk tanúi. Az állattenyésztésben a hagyományos eljárások mellett a korszerű biotechnológiai módszerek jelentősége folyamatosan nő.

A biotechnológia - definíciója szerint - olyan mezőgazdasági, ipari ágazatban használatos eljárás, amelyet olyan élőlényekkel folytatnak le, melyek örökítő anyagát tudatosan módosították.

A biotechnológia lehetőségeit jól illusztrálják Dohy [35] szavai: „A molekuláris genetikára felépülő új biotechnológia a DNS irányított megváltoztatására irányul, olyan új technikák alkalmazásával, melyek korábban nem álltak rendelkezésre, és amelyek forradalmasíthatják az alkalmazott genetikát. A magyar állattenyésztés gyorsütemű mennyiségi és minőségi fejlesztésének, nemzetközi piac- és versenyképességének biztosítása nemzetgazdasági szintű és stratégiai jelentőségű feladat. Ennek megoldásához az új biotechnológia a fejlődés katalizátoraként járul hozzá.”

Az első sikeres sertés embrió átültetést Magyarországon az Állattenyésztési és Takamányozási Kutatóintézet munkatársai [12] hajtották végre 1986-ban. A sertés in vitro fertilizációs kísérletek ugyancsak ebben az Intézetben folytak Koppány [87] vezetésével a nyolcvanas évek végén. Jelenleg Rátky foglalkozik endoszkópos sertés embrió mosással/beültetéssel az ÁTK-ban. Társintézetként velük együttműködésben a Nyugat-Magyarországi Egyetemen a mi kutatócsoportunk foglalkozik sertés in vitro maturáltatással, fertilizációval és embriótenyésztéssel.

A jól működő in vitro maturációs rendszerrel kellő számban tudunk előállítani secunder oocytákat, melyek termékenyíthetők friss, mélyhűtött,

ivarorientált spermával, v. direkt (ICSI, SUZI) termékenyítési eljárásokkal, szomatikus sejtek, embrionális őssejtek, primordialis csíra sejtek v. totipotens blastomerek recipiensei lehetnek a nukleáris transzfernél.

Régóta ismert, hogy a filogenetikai távolság ellenére a sertés anatómiai és fiziológiai felépítésében hasonló az emberhez, ezért jöhet szóba a xenotranszplantációs (idegen fajból származó szervek emberbe juttatása) műtéteknél. A xenotranszplantáció gátja az idegen fajból származó szervek vagy szövetek azonnali kilökődése. Ma már rendelkezésünkre állnak olyan eljárások, amelyekkel lehetséges különböző szöveti sejtek genetikai módosítása. Ezen sejtek nukleáris transzferrel enucleált secunder oocytába juttatásával létrehozhatók transzgénikus állatok, melyek szervei alkalmasak a beteg emberi szervek (szív, máj, vese ) pótlására. Előállíthatók olyan transzgénikus sertések is, melyek különböző emberi betegségek modellállatai lehetnek (arteriosclerosis, sclerosis multiplex, Parkinson kór).

Hazánkban az új állatvédelmi törvény bevezetésével az in vitro eljárások jelentősége állandóan növekedik. A sertés petesejtek in vitro érlelésével morfológiailag látszólag teljesen érett petesejtek állíthatók elő, de az elégtelen mag- és citoplazmatikus érés következtében az in vitro fertilizáció hatékonysága kicsi, nagyfokú a polispermia és elégtelen az embriók fejlődése. Igazolt, hogy a tüszőfolyadékban különböző ágensek halmozódnak fel, melyeket a tüsző szomatikus sejtek termelnek, és ezek befolyásolják a petesejtek érését. Az egyik legizgalmasabb kutatási terület napjainkban a különböző növekedési faktorok hatásának vizsgálata.

Az ortografikus írásmód kialakításához az anatómiai kifejezéseket a latin, minden más szakkifejezést a magyar helyesírás szabályai szerint használok.

**Az értekezés célkitűzései:**

- Célom, hogy a nukleáris transzfer és más in vitro manipulációs kísérletekhez rendelkezésre álljanak érett secunder oocyták, illetve embriók, ehhez egy in vitro maturációs, fertilizációs, embriótenyésztési rendszer létrehozása szükséges. Első lépésben tanulmányozni kell a különböző maturációs közegekben a meiózis újraindulását.
- Vizsgálandó a különböző spermiumkoncentrációk alkalmazásának hatása a fertilizációra.
- Meghatározandó a sertés petesejtek különböző in vitro maturációs közegekben való érlelésének hatása az in vitro fertilizációs paraméterek alakulására.
- Vizsgálandó a különböző kanoktól nyert mélyhűtött/visszaolvasztott spermiumokkal történő termékenyítés hatása a fertilizációs paraméterek alakulására.
- Összehasonlítandó az érett petesejtek termékenyülése különböző fertilizációs közegekben, valamint petevezető egyrétegű sejttenyésztettel történő kokultiválást alkalmazva.
- Meghatározandó a különböző növekedési faktoroknak a meiózis újraindításában játszott szerepe, különös tekintettel az EGF (Epidermal Growth Factor) és NGF (Nerve Growth Factor) szerepének tisztázására.
- Összehasonlítandó a maturáltatás alatti kokultiválás tüszőfal-sejtdarabokkal vagy EGF kiegészítéssel.

## IRODALMI ÁTTEKINTÉS

A téma irodalmi feldolgozásánál lényegesnek tartottam, hogy áttekintsem a női gaméták és képződési helyük: a petefészek anatómiájának és funkcióinak ismertetését, melyhez az amerikai tanulmányutamon feldolgozott, 4500 oldalas, 1999.-ben megjelent „Encyclopedia of Reproduction” köteteket is felhasználtam. A következő fontos téma az emlős embriók fiziológiai és anatómiai tulajdonságainak ismerete, különös tekintettel az embriófejlődés során bekövetkező változásokra. Mindezek alapos tanulmányozása elengedhetetlenül szükséges a közeljövőben tervezett embriómanipulációs kísérleteinkhez. Az in vitro embrió kultiváció történeti áttekintése után, az in vitro embrió előállítás fázisainak nemzetközi irodalmából vett szemelvényeket, végül a sertés embrió tenyésztés és manipulálás néhány fontos területét érintő kutatásokat ismertettem.

### I. A PETEFÉSZEK

#### 1. A PETEFÉSZEK KIALAULÁSA ÉS FEJLŐDÉSE

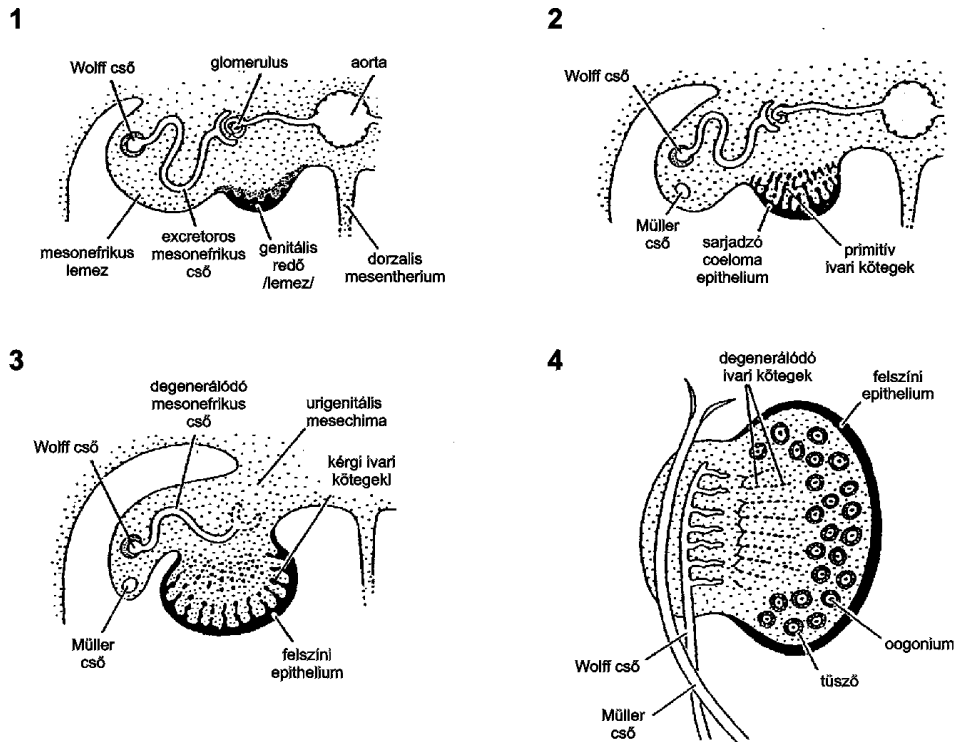
Ovarium: női gonád, olyan szerv melyben a női gaméták (oocyták) helyezkednek el, és olyan hormonokat termel, mely a szaporodásbiológiai funkciók fenntartásához szükséges. Először Aristoteles írta le ezt a szervet 2000 évvel ezelőtt. A petefészek működésének áttekintése segít bennünket abban, hogy megértsük azt a csodát, amely az élet megújulásának háttére.

A gonádok fejlődése függ az egyedek genetikai meghatározottságától. A testist meghatározó gén az Y kromoszómán helyezkedik el és működése szükséges a hím nemi mirigyek kialakulásához. A feltételezett Z-gént, mely az ovarium differenciálódásáért felelős szupresszálja az Y kromoszóma génje, így az csak akkor tud működni, ha az Y kromoszóma nincs jelen. Sajnos eddig a Z-gént nem sikerült izolálni.

A gonádok nemek szerinti differenciálódása a korai embriófejlődésben bekövetkezik. Négy fő lépést különíthetünk el (*1. ábra*).

1. Az embrió sziktömlő endodermájából származó primordiális csírasejtek, melyek aránylag nagy sejtek, először passzív mozgással, majd amőboid mozgással haladva a bél mesenteriumában összetömörülve a genitális redőt (lemezt) alkotják.
2. Ezután következik a primordiális csírasejtek és a bél epithel sejtek proliferációja, az ivari kötegek kialakulása. Ez a fejlődés egy indifferens gonád kialakulásához vezet.
3. Az eredeti elsődleges kötegek degenerálódnak, új a cortexhez közeli kéregállomány alakul ki.
4. Kialakul a petefészek kéreg és velő (medulla) állománya. Az ivari kötegek mindegyike nyalábokat alkot és körülveszi a csírasejteket. A csírasejtek oogoniumokká alakulnak és a környező epitheliális sejtek granulosa sejtekké differenciálódnak. Az ovarium mezenchimalis sejtjei theca sejtekké alakulnak. A granulosa és theca sejtek körülveszik az oogoniumokat és együttesen tüszőket alkotnak [212].





1. ábra. A petefészek kialakulása (Yao, 1999 nyomán) [211]

## 2. A PETEFÉSZEK ANATÓMIÁJA

Az ovarium egy vér és nyirokerekkel jól ellátott, számos idegvégződést tartalmazó szerv. Az ovarialis arteria az abdominalis aortából ered és a hiluson keresztül lép be a petefészekbe, ahol a vénás erek távoznak. A szimpatikus és paraszimpatikus beidegződés szintén a hiluson keresztül történik. Néhány madár és hüllő kivételével a gerinceseknél a petefészek páros szerv. A petefészek bár méretében elég nagy változatosságot mutat, felépítésében nagyfokú hasonlóság tapasztalható a különböző állatfajoknál [184]. Az ovarium felépítése a következő: egy belső medulláris és egy külső kéreg részből áll, ahol a tüszők elhelyezkednek. A legkülső réteg a peritoneumból származó kuboidális sejtekből álló germinális epithelium. Ez alatt helyezkedik el a tunica albuginea, kötőszöveti réteg, amely az

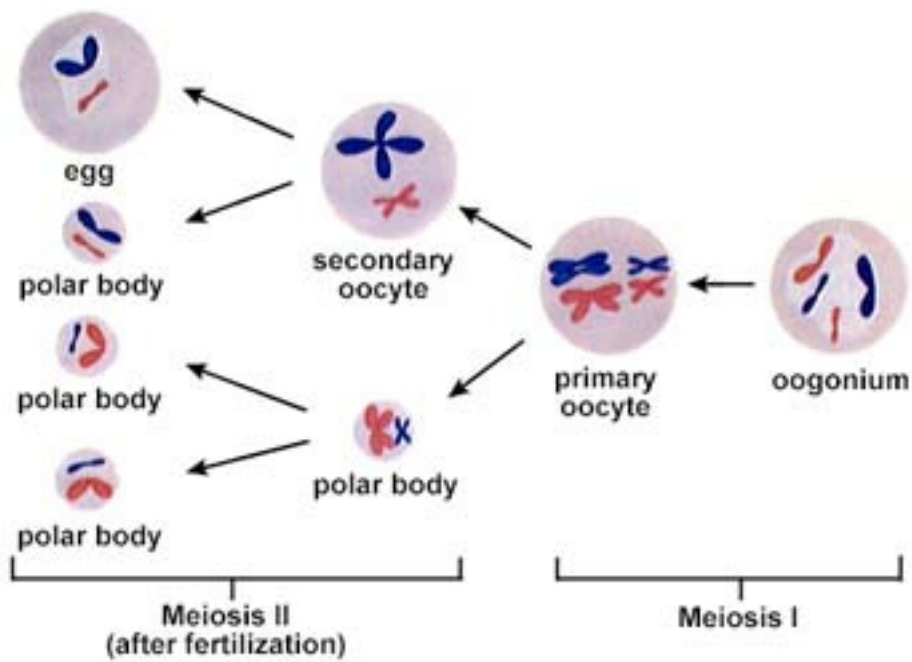
ovarium világos színét adja. A stroma legalább három különböző sejttípusból áll: kötőszöveti sejtek (fibroblast) melyek szállító feladatokat látnak el, simaizom sejtek, melyek szabályozzák a vérerek lumenét, intersticiális sejtek, melyekhez tartoznak a differenciálatlan theca sejtek és a degenerált tüszősejtek az atretizálódott folliculusból és a regresszálódott corpus luteumból. A tüszők (folliculus - kis zsák) a legbonyolultabb és funkcionálisan a legfontosabb egységei a petefészek kéregnek. A primordialis sejtek mitotikus aktivitása nagyon magas a korai embriófejlődés alatt, egégnél minden 18 órában megkétszereződik a számuk az embrionális fejlődés 8.-14. napja között. A folliculusok mikroszkopikus képe különböző a fejlődési állapotnak megfelelően, de az alapvető sejtes szerveződés változatlan. A tüsző tartalmazza a petesejtet és az azt körülvevő tüszőfalat. Az oocyta és a tüszőfal között elhelyezkedő vékony áttetsző membrán a zona pellucida. A tüszőfal egy belső granulosa és egy külső theca rétegből áll. A granulosa réteg körülveszi a petesejtet és a bazális membrán választja el a theca rétegtől. Az érett folliculusban a theca réteg tovább osztható theca internára, mely differenciált szteroid termelő sejteket tartalmaz és theca externa-ra, amely főleg kötőszöveti sejtekből áll. A theca interna és externa határa nem éles, ugyanez a helyzet a theca externa és a petefészek stroma között. Az ér és idegvégződés a theca internában található. Bármelyik tüszőfejlődési állapotot tekintjük, nem található ér és idegvégződés a granulosa rétegben. Ha az ovuláció megtörtént a vér, amely a felhasadt folliculus fali ereiből származik, infiltrálódik az összeesett tüszőbe és a „corpus hemorrhagicum”-ot eredményezi. A luteinizálódott granulosa és theca sejtek megkezdik osztódásukat, és betöltik az antralis üreget, „corpus luteum”-ot (sárgatest) formálva. A vérerek a theca rétegből áthálózják a lutealis sejtréteget. Ha nem történik vemhesülés a sárgatest degenerálódik. A stroma sejtek makrofágként működve kialakítják a „corpus albicans”-t (fehértest) [212].

### 3. A PETEFÉSZEK FUNKCIÓI

#### 3. 1. NŐI GAMÉTÁK TERMELÉSE

##### *Oogenezis*

A női gaméták, vagy oocyták szolgáltatják az anyai örökítő anyagot és a tápanyagokat az embriók korai fejlődéséhez. A petefészek oocyták ezreit táplálja és szolgál inkubátorként a fejlődésükhöz. (2. ábra) Az oocyták fejlődése (oogenezis) a primordialis csírasejtekkel kezdődik, melyek az ivari redőkben helyezkednek el és mitotikus osztódásukkal képződnek az oogoniumok. Az oogoniumok elsődleges oocytákká (4C DNS, 2n kromoszóma) válnak és megkezdődik az első meiózisos osztódásuk. Az elsődleges oocyták a meiózis első szakaszának diplotén fázisában maradnak mindaddig, míg ovuláció előtt a petesejt magmembrán (germinalis vesiculum) dezintegrálódik, ezt a folyamatot „germinal vesicle breakdown”-nak magmembrán feloldódásnak nevezzük. A petesejt citoplazmájának megoszlása nem egyenletes: a citoplazma fő tömege a másodlagos petesejtet alkotja, a citoplazma egy kis része egy sarkitestet képez (mindkettő 2C DNS-t, 1n kromoszómát tartalmaz). Ez utóbbi esetleg osztódik, majd degenerálódik. A másodlagos oocyta megkezdí a meiózis második szakaszát, de a folyamat a metafázis II szakaszban leáll. A sejtosztódás akkor folytatódik, amikor a petesejtbe egy spermium penetrálódik, ez a folyamat a fertilizáció, amely a petevezetőben játszódik le. Az osztódás eredménye egy haploid petesejt és a második sarkitest (1C DNS és 1n kromoszóma). A legtöbb fajban a meiózisos aszinkronban folynak, így a magzati petefészekben a mitózis és meiózis összes formációi fellelhetők [184]. Végeredményben egy primer oocytából egy petesejt és két esetleg három polocyta képződik. A folyamatot a 2. ábrán szemléltetem. Ezzel szemben egy primer spermatocytából négy haploid spermium keletkezik.



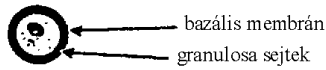
2. ábra. Az oogenezis folyamata / Karp,1999 nyomán/

Minden csírasejt a fejlődő ovariumban általában még a születés előtt megkezdí meiózisos osztódását, és nem tér vissza a mitózisba. Így születéskor adott az oocyták mennyisége, és számuk a kor előrehaladtával a folyamatos atresiák és ovulációk következtében egyre csökken [11]. A kiindulási petesejtszám és a valóban éretté vált petesejtek száma közötti óriási különbség mutatja a szelekció nagyságát, csak a legkiválóbb minőségű petesejtek képesek az érésre. A sertés petefészkekben igen nagy számú primordialis folliculus található (210000) több mint más állatfajban, pl. juh (160000), szarvasmarha (120000), ló (36000), egér (2000) [69]. Az elsődleges folliculusokból származó petesejtek maturációjára és a sperma penetrációra vonatkozó kutatások folynak [80], de több kísérleti eredmény azt mutatja, hogy nehezen oldható meg a petesejtek meiotikus érlelése ilyen forrásból.

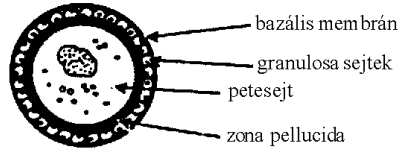
### ***Folliculogenezis***

Az oocyták általában egyesével tüszőkben (folliculusokban) helyezkednek el és szoros kapcsolatban állnak a körülvevő fali sejtekkel. A petesejtek érése (oogenezis) szorosan összefügg a tüszők fejlődésével (folliculogenezis). A folliculogenezis (3. ábra) mindig az emlős petefészek kéreg belsejében kezdődik. A primordialis folliculusokban az elsődleges oocyta a bazális membránnal és egy granulosa réteggel van körülveve. Amint a primordiális folliculus primer folliculussá fejlődik a granulosa réteg fokozatosan átalakul köbös sejtekké és az oocyta és a granulosa sejtek kiválasztják a zona pellucidát. A szoros kapcsolódás (gap junction) az oocyta és granulosa sejtek között biztosítja az intercelluláris kommunikációt és a kis molekulák transzportját, így a tüsző granulosa sejtjei szinticiumként működnek, ez teszi lehetővé a meiózis újraindítását később. A primer folliculus fejlődése folytatódik és a granulosa sejtek mitotikusan osztódnak, és a szekunder tüszőben 2-6 réteg granulosa található. A theca egyrétegű, és a bazális membrán választja el a granulosa sejtektől. A terciar folliculusok kialakulása során a granulosa sejtek folyadékot választanak ki, amely a sejtek között felhalmozódik. Nagy mennyiségű folyadék diffundál ki a theca réteg véredényeiből és hozzáadódik az előbb említett folyadékhoz. Ez a folyadék kitölti az antralis üreget, és ezt hívjuk tüszőfolyadéknak. A follicularis folyadék szteroid és protein hormonokat, antikoagulánsokat, enzimeket, elektrolitokat tartalmaz, hasonló a vérszérumhoz, mind megjelenésében, mind összetételében. A terciar folliculusok több mint 4 rétegű granulosaat tartalmaznak, és a theca réteg is ekkor differenciálódik: a belső theca internára és a külső theca externára a bazális membrán közelében elhelyezkedő stroma sejtekből. A theca interna sejtjei epitheloid jellegűek és

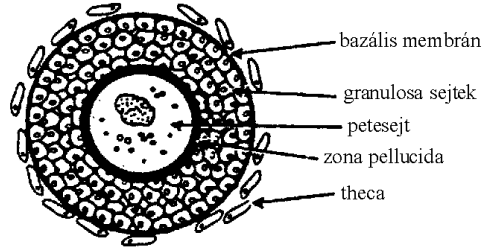
primordiális  
folliculus



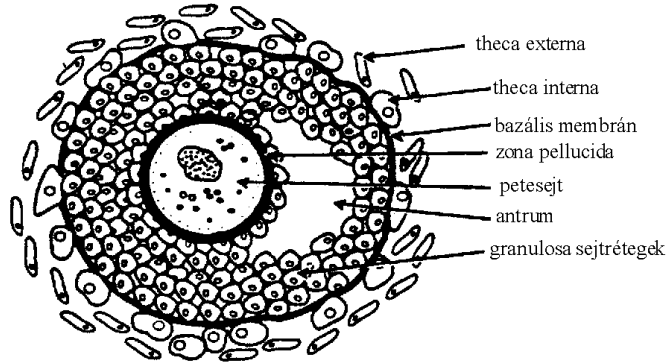
elsődleges  
tüsző



másodlagos  
tüsző

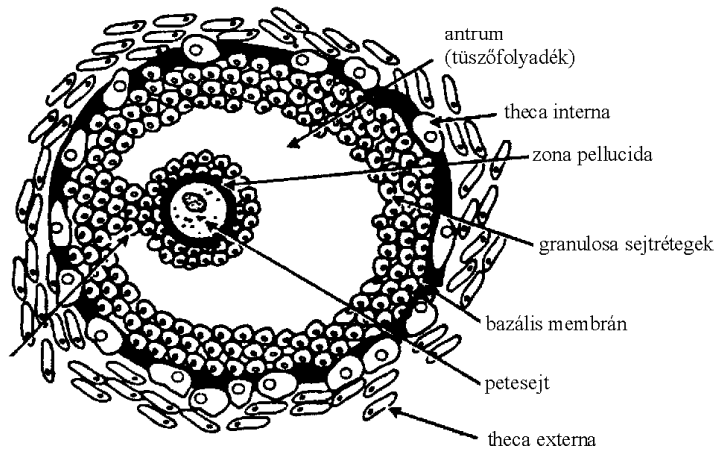


harmadlagos  
tüsző



Graaf  
tüsző

cumulus oophorus  
granulosa sejtek



3. ábra. Folliculogenezis (Van Voorhis, 1999 nyomán) [194]

szteroid kiválasztó sejtek. A theca externa sejtjei megőrzik orsó alakjukat és beleolvadnak a környező stromába. A theca réteg androgéneket választ ki, mely a granulosa sejtek ösztradiol képzésének szubsztrátja. A terciér folliculus ürege folliculáris folyadékkal kitöltött, a petesejt a fallal egy granulosa sejtekből álló „nyél”-en keresztül kapcsolódik, az oocytát közvetlenül körülvevő, a petesejthez szorosan kapcsolódó granulosa sejtek alkotják a „corona radiata”-t. Ezt az állapotot nevezzük Graaf-féle tüszőnek, mely egy áttetsző hólyagnak látszik, és amely rendszerint az ovarium felszínén kiemelkedik. Azokat a sejteket, amelyek a folliculáris üreg közelében helyezkednek el „antralis granulosa”, míg a bazális membrán közeli sejteket „muralis granulosa” sejteknek nevezzük. A folliculus granulosa sejtek nem homogének aktivitásukban és funkcióikban sem, pl. a muralis granulosa sejtek szteroidogenezise sokkal aktívabbak, mint a „cumulus oophorus” sejté. A kis antrális tüsző gyorsan növekedik, a tüszőnövekedés végső stádiumában a preovulációs folliculus erősen vascularizálttá válik, és órákkal az ovuláció előtt az erek behatolnak a granulosa rétegbe is. Bár az ovarium egyik legfontosabb feladata, hogy oocytákat termeljen, mint az előbbieken említettük a petesejtek többsége nem ovulál. Az oocyták száma a petefészek kialakulása után maximális. A petesejtek 70-99,9%-a eliminálódik az ovuláció elérése előtt, ezt a degenerációs folyamatot atréziának nevezzük. Az atrézia univerzális jelenség az állatvilágban, emlősökre és egyéb gerincesekre egyaránt jellemző. A folliculusok a fejlődés bármely stádiumában atretizálódhatnak. Néhány folliculus primer tüsző állapotban, mások terciér tüsző korban dezintegrálódnak. A most folyó kutatások szerint az apoptózis, vagy programozott sejthalál az a molekuláris jelenség, mely az atrézia mögött áll, hormonális szabályozása a jelenségnek nem teljesen ismert. Tisztázták már, hogy az atretizáló tüszők follicularis folyadéka sokkal androgenikusabb mint az egészséges folliculusoké. Az egészségesen fejlődő tüszőkben az androsztendion ösztradiol arány alacsony és a granulosa sejtek aromatáz aktivitása

nagyfokú. Ezzel szemben az atretizálódó tüszőkben az androsztendion aránya nagyon magas az ösztradiolhoz viszonyítva, és az aromatáz aktivitás nagyon alacsony vagy teljesen hiányzik. Amilyen mértékben degenerálódik a tüsző, annak arányában veszti el képességét arra, hogy az FSH és LH hatására reagálni tudjon. Az apoptózis egy aktív energiaigényes folyamat, amely lehetővé teszi a sejtek szelektív delécióját. Morfológiailag az apoptozist a mag kromatin kondenzációja vagy piknotikussá válása jelzi. Az apoptózis úgy jellemezhető, mint a genomiális DNS fragmentációja. A granulosa sejtek apoptozisát a gonadotropinok késleltetik, míg az oxidatív stressz hatására az apoptózis bekövetkezik. A folliculusok fejlődése nem lineáris: mesterségesen három csoportot állíthatunk fel: preantrális növekedés a primordialis folliculus primer follikulussá alakulásával kezdődik és a preantrális tüszőfejlődéssel zárul. A kis tüszők növekedése nagyon lassú. A következő szakasz az ún. tónusos szakasz, mely a kis antrális folliculusoktól a terciér tüszőig tart, ez a fázis lényegesen rövidebb. Ezután következik az exponenciális szakasz, amely hossza megegyezik a ciklus hosszával, kezdve az egyik ciklus midluteális fázisától a következő ciklusban az ovulációig [194].

### **3. 2. HORMONTERMELÉS**

Az ovarium másik fontos funkciója a hormontermelés, amelyet a hipotalamus-agyalapi mirigy rendszer szaporodás szervrendszerre ható hormonjai (GNRH, FSH, LH) irányítanak, és petefészek hormonokkal együtt hatva befolyásolják a szaporodási szervek funkcióit is. Ez az együttműködés biztosítja a sikeres tüszőfejlődést, ovulációt, fertilizációt és a megfelelő embrionális fejlődést. Az ovarium szteroid és nem szteroid hormonokat termel. A szteroid hormonok zsírdékonyak és a koleszterinből származnak, az ivari hormon kötő fehérjékhez kapcsolódnak és a májban vagy vesében bomlanak le. A nem szteroid hormonok



vízoldékonyak, peptid hormonok és növekedési faktorok, befolyásolják a sejtosztódás és differenciálódás folyamatait. Míg a szteroidok a theca, granulosa és sárgatest sejtekben termelődnek, a nem szteroid hormonok elsősorban a granulosa és sárgatest sejtekben, azaz a theca sejtekben nem [195].

### **A. Szteroid hormonok**

A petefészek a koleszterolt használja prekuzorként a szteroid szintézishez. A koleszterol progesztrinre, androgénre és ösztrogénre bomlik a tüszők különböző sejtjei által.

#### **A.1. Ösztrogén**

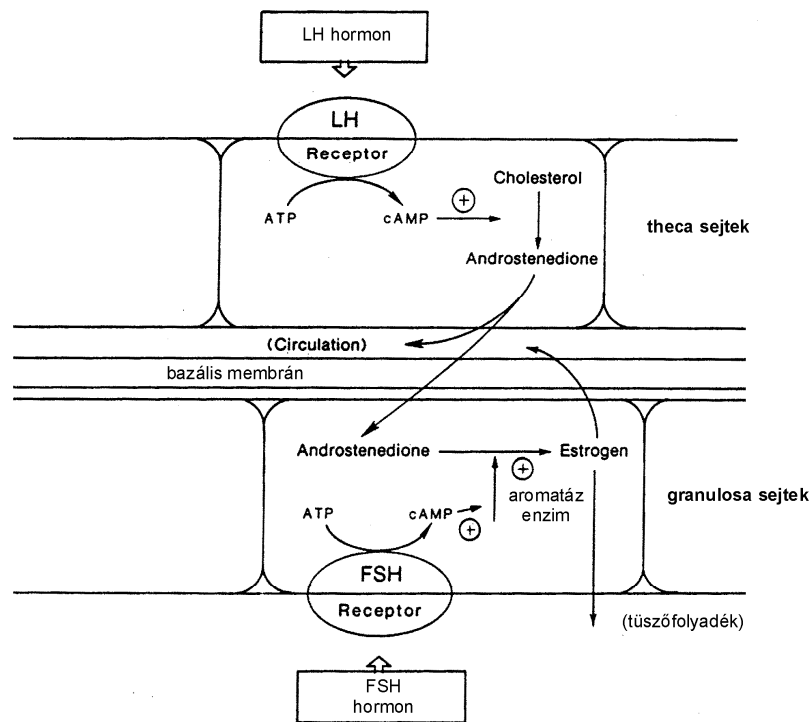
Fiziológiásan az ösztrogének különösen az ösztron és ösztradiol  $17\beta$  a legfontosabb petefészek szteroidok. Az androsztendion és a tesztoszteron a közvetlen bioszintetikus prekuzorai az ösztronnak és a  $17\beta$  ösztradiolnak is. Az ösztron volt az első szexuál szteroid, amelyet izoláltak és azonosítottak [212]. Az ösztrogéneket elsősorban a granulosa sejtek termelik, a theca sejtek által termelt androsztendiont prekuzorként felhasználva. A granulosa sejtek számos FSH receptort tartalmaznak, melyek stimulációja segíti a theca androgén aromatizációját ösztrogénné. A korai tüszőfázisban, a granulosa sejtek csak FSH receptorokat tartalmaznak. Amint a tüsző növekedik, az ösztrogén termelés is nő az LH theca sejtek általi stimulálásával valamint a granulosa sejtekre való FSH hatás következtében. Ez további FSH kiválasztást indukál, valamint LH receptorok kialakulását a granulosa rétegben. Amint az LH receptorok kialakulnak megkezdődik a progeszteron termelés. Az ovuláció után a granulosa sejtek sárgatest sejtekké alakulnak, az LH stimulálja a sárgatest sejtek progeszteron és ösztrogén termelését. Mind az LH mind az FSH speciális receptorokhoz kötődik és szükséges egy megfelelő szintű cAMP szint az ösztrogén termeléshez, amelyet a cAMP proteinkináz szabályoz. A termelődött ösztrogén kb. 60%-a az ivari-hormon-kötő-fehérjéhez (sex-hormone-binding

globulin SHBG) kapcsolatosan transzportálódik, 20% albuminhoz kötötten, és 20% szabadon. Az ösztrogén a májban és a vesében bomlik le, és az epével vagy húgysavval ürül. Az ösztrogén átjut a sejtmembránon és intracelluláris receptorokhoz kötődik, az aktivált receptorokhoz kapcsolódó elemek a kívánt gén promoter régiójához kötődnek és megindul a riboszomális és mRNS szintézis. Az ösztrogén stimulálja a méh, a petevezető, a nyakcsatorna, a hüvely, az emlő fejlődését az ivarérettség alatt és alakítja a másodlagos nemi jellegeket. A méh endometrium proliferációját irányítja, növeli a miometrium elektromos aktivitását és ebből adódóan a méh összehúzódásokat és a méh érzékenységet az oxitocinra. Az ösztrogén befolyásolja a cervix által kiválasztott szekréta összetételét, növeli a hüvely pH-ját ezzel nagyobb védelmet nyújt a baktériumokkal szemben. Az ösztrogén határozza meg az állatok ivarzás alatti viselkedését. Az ösztrogén felelős a zsírrakódásért a bőr alatti szövetekben, befolyásolja a víz, só, kalcium háztartást. Az ovariumon kívül a placenta és az adrenális cortex választ ki ösztrogént. A here aránylag kevés ösztrogént választ ki [214].

## A. 2. *Androgén*

Az ivari hormonoknak azt az osztályát nevezzük így, amelyet a herék adrenális kérge választ ki, de az ovariumban is történik androgén kiválasztás. A petefészekben elsősorban a preovulációs folliculus theca interna sejtei termelik. A fő petefészek androgének az androsztendion és a tesztoszteron. A theca sejtek LH receptorai által észlelt magas LH szint hatására termelődik androsztendion és tesztoszteron (mindkettő ösztrogén prekursorokból), amely aztán ösztrogénné alakul át. A „két sejt, két hormon” elmélet alapján az LH a theca sejtek specifikus membrán receptoraihoz kötődik és serkenti a cAMP termelést és a koleszterol androgénekké, elsősorban androstendiollá és tesztoszteronná, való átalakulását. Ezek az androgének a véráramba és a bazális membránon keresztül a granulosa sejtekbe diffundálnak. Az

FSH a granulosa sejtek speciális membrán receptoraihoz kötődik és serkenti a cAMP termelést, amely megnövekedett aromataz enzim aktivitást eredményez és a theca sejtek által termelt androgének ösztrogénné való alakulásához vezet (4. ábra). Ha túl nagy mennyiségben van jelen, akkor gátolja a petefészek normális működését és másodlagos hím nemi jellegek kialakulását eredményezi [214].



4. ábra. Ivari hormonok termelődése a szomatikus sejtekben (Yao, 1999 nyomán) [212]

### A. 3. Progesztinek

A progesztineket (a progeszteron és 17 hidroxiprogeszteron) elsődlegesen a sárgatest sejtjei termelik. A granulosa sejtek által termelt ösztrogén az FSH-val szinergizmusban elősegíti a granulosa sejtek LH receptorainak kialakulását. Ezekben a granulosa sejtekben az LH hatására fokozódik a progeszteron termelés [195].

Ovuláció után a granulosa és theca sejtek sárgatest sejtekké válnak. Ezek a sejtek tartalmaznak LH receptorokat, és az LH stimulus hatására ösztrogént és progeszteront termelnek. A progeszteron prekursora az androgénnek és az ösztrogénnek, amelyet a korai tüsző granulosa sejtek kivételével az összes endokrin petefészek sejt termel. Az ösztrogénhez hasonlóan a progeszteron is közvetlenül a sejtmaghoz kötődik, és növeli a cél gén aktivitását. A májban és a vesében bomlik le. A fő metabolitja a pregnandiol. A progeszteron befolyásolja a proli-feratív típusú endometrium átalakulását szekretoros típusúvá, amely utóbbi optimális az embrió implantációhoz. A miometrium transmembrán potenciál növelésével csökkenti a méhösszehúzóerőket és a méh válaszát az oxitocinra. A progeszteron növeli a viszkózus, savas cervikális nyálka termelést, amely akadályozza a spermiumok haladását a petevezetőben. Sertésnél a progeszteronnak legfontosabb szerepe a vemhesség fenntartása, ezen kívül a progeszteron növeli a testhőmérsékletet, amely az ovuláció meghatározásának alapja. Az ösztrogénnel együtt felelős az emlő mirigyszövetének fejlődéséért. Progeszteront termel a placenta is, amely a vemhesség fennmaradását segíti. A progeszteron előkészíti a méhfalat a blastocysta implantációjára és további fejlődéséhez. Gátolja a méhfal izomzatának összehúzóerőjét, amelyet a megtapadni kívánó blastocysta vált ki. A vemhesség alatt a progeszteron stimulálja az emlőmirigyek fejlődését az ellés utáni szoptatáshoz [214].

## **B. Fehérje és peptid hormonok**

### ***B. 1. Inhibin***

Több mint 60 éve feltételezték az inhibinnek, mint nem szteroid hormonnak a jelenlétét, amely befolyásolja a gonadotropin kiválasztást. Az inhibin volt a petefészek folyadékából először izolált polipeptid hormon 1985-ben. Az inhibin két oldalláncból áll ( $\alpha$ ,  $\beta$ ), amelyet diszulfid hidak kapcsolnak össze, alapvető funkciója

, hogy szupresszálja az agyalapi mirigy FSH termelését[195]. Az inhibint a petefészek preovulációs tüszőinek granulosa sejtjei termelik elsősorban, valamint kisebb mennyiségben a sárgatest és a theca sejtek. Az inhibin mennyisége növekedik a késői tüszőfázisban és a sárgatest fázisban a legmagasabb a szintje. Az inhibin mennyisége megegyezik a progeszteron mennyiségével. Az inhibin szintjét elsősorban az FSH befolyásolja és ezáltal a tüszők fejlődésének szabályozásában játszik szerepet. Az inhibin célzottan szupresszálja mind a bazális mind a GNRH által szabályozott FSH szintézist és kiválasztást az LH kiválasztás befolyásolása nélkül. Az inhibin paracrin és autocrin funkcióval egyaránt rendelkezik. Bár az inhibint a granulosa sejtek felszínéhez kötötten fedezték fel az inhibin receptorokat még nem sikerült izolálni. Az inhibin stimulálja a luteinizálódott granulosa sejtek fejlődését és elnyomja a granulosa sejtek FSH által szabályozott ösztrogén termelését. Az androgén termelést is stimulálja és az LH-val és IGF-I-gyel együttműködve növeli a theca sejtek androgén termelését. A legújabb kutatási eredmények alapján igazolt, hogy az inhibin szerepet játszik a tüszőfejlődés szabályozásában, valamint feltételezhető, hogy tumor szupresszor géneként működik [212].

## ***B. 2. Aktivin***

1986-ban felfedeztek egy olyan polipeptidet, amely képes az agyalapi mirigy FSH szekrécióját növelni és ezt a vegyületet aktivinnak nevezték el. Ez a hormon két inhibin  $\beta$  láncból áll. Membrán receptorai ismertek. A granulosa sejtek termelik főként, de a sárgatest sejtek nem. Az inhibin/aktivin  $\beta$  alegység expresszió az éretlen tüszőkben a legnagyobb. Az aktivin szint nem változik az ivari ciklus alatt. Az aktivin hatása sokkal összetettebb, mint először gondolták [212]. Amellett, hogy az aktivin stimulálja az agyalapi mirigy FSH termelését (endokrin hatás), régóta tudjuk, hogy befolyásolja a petefészek granulosa sejtek differenciálódását. Az aktivin

redukálja a HCG által stimulált dehidroepi-androszteron akkumulációt és az IGF-I és LH által stimulált androgén termelést a theca sejtekben, de növeli a pregnolon és a dehidroepiandroszteron tesztosz-teronná való alakulását a theca sejtekben (paracrin hatás). Az aktivin növeli a granulosa sejtek FSH által stimulált progeszteron és ösztrogén termelését, valamint, az FSH által indukált aromatáz aktivitást. Az aktivin csak az alap inhibin szekréciót befolyásolja, nem hat a progeszteron és ösztadiol termelésre. Az aktivin indukálja az FSH receptor expressziót és növeli az FSH indukálta LH receptor expressziót a granulosa sejtekben. Aktivin patkány petefészekbe injektálásával nagymértékű folliculus atrézia következik be, míg majom petefészekbe juttatva felfüggeszti a tüszőérést. Világos, hogy az aktivinnak jelentős szerepe van a folliculogenezisben. Az aktivin szerkezetében hasonló az inhibinhez és a TGF- $\beta$  szuperfamiliához tartozik, hatásában gyakran az inhibin antagonistája az agyalapi mirigy és egyéb szervek vonatkozásában is. Az aktivin agyalapi mirigyre gyakorolt hatása mellett jelentős szerepe van az eritrocyták és a megakariocyták differenciálódásában, az idegsejtek élettartamának befolyásolásában és a mesodermális indukcióban. Jelentős szerepe van az embriogenezis és differenciálódás folyamatában, a sejtosztódás és daganatos folyamatok befolyásolásában [214].

### ***B. 3. Follisztatin***

A follisztatin egy egyláncú polipeptid, eredetileg a petefészek folyadékából izolálták, mint más FSH szekréciót befolyásoló gátlóanyagot. A follisztatin szintézis a granulosa, theca és sárgatest sejtekben folyik. Bár a follisztatin mRNS expresszálódik mind az egészséges, mind az atretizálódott tüszőkben, a follisztatin fehérje csak a terciar folliculusokban és az újonnan alakult sárgatestekben található. Sok korábbi kísérlet igazolta, hogy a follisztatin az aktivin inhibitoraként működik. A follisztatin mind az aktivinhoz, mind az inhibinhez képes kötődni a közös  $\beta$  láncukon keresztül, és az aktivin néhány hatását közömbösíti, de az inhibin hatását nem. A

follisztatin valószínű lokálisan befolyásolja az aktivin hatását, ez a magyarázata annak, hogy az aktivin nem minden hatását csökkenti, de az aktivin osteoblastokra, granulosa és embrionális karcinoma sejtekre gyakorolt hatását közömbösíti [212].

#### B. 4 Növekedési faktorok

Az ovárium nemcsak endokrin hormonokat termel, hogy szabályozza más szaporodás szervrendszerbe tartozó szerv működését, hanem növekedési faktorokat is. Sok növekedési faktort, mint az IGF (insulin like growth factor= inzulin szerű növekedési faktor), TGF (transforming growth factor= átalakító növekedési faktor), EGF (epidermal growth factor= hámnövekedési faktor) a petefészek csírasejtjei és szöveti sejtjei termelik. Ez a komplex intraovariális regulációs rendszer alkalmas arra, hogy ragyogó interaktív kommunikáció jöjjön létre a petefészken belül.

#### IGF: Inzulin szerű növekedési faktor

Először, a növekedési hormon (STH) sejtek növekedésére gyakorolt hatásának közvetítőjeként fedezték fel és szomatomedinnek nevezték. Az IGF egy egyláncú polipeptid és nagyfokú homológiát mutat az inzulinnal, a sejtek felszínén meghatározott receptorokhoz kötődik. Az IGF a petefészekben főleg a theca-intersticiális sejtekben termelődik. Kimutatták az uterus szöveti folyadékában is. Az IGF expressziót a gonadotropinok és az ösztrogén serkenti. FSH hatására megnövekedik az IGF receptorok száma és az IGF kötődése a granulosa sejtekhez. Az IGF stimulálja a granulosa és theca sejtek proliferációját és szteroid-genezisét az éretlen tüszők preovulációs tüszővé alakulásakor [105]. Az IGF mennyisége jelentős mértékben nő a késői tüszőfejlődés alatt és csökken az atrézia idején. Az IGF fő funkciója, hogy teljessé tegye a gonadotropinok hatását a tüszőfejlődésre. Az IGF szinergizmusban az FSH-val növeli az ösztrogén progeszteron és inhibin termelést.

Az IGF elősegíti a LH receptorok számának növekedését, valamint az androgén hormon növekedését. A granulosa sejtek növekedését és differenciálódását egyaránt serkenti [214]. A kétsejtes egémbriók blastocystává fejlődését elősegíti in vitro [143]. Ugyanezt tapasztalták szarvasmarha embriók in vitro kultivációs közegének IGF kiegészítésével [102, 145].

EGF: Hámnövekedési faktor

Egy 6 kDa molekulásúlyú, egyláncú polipeptid, amely 53 aminosavból áll 3 diszulfid hidat tartalmaz, amely meghatározza a harmadlagos szerkezetét és biológiai aktivitását. Először egér nyálmirigyéből izolálták [27]. Az EGF serkenti a különböző epidermális és epithel sejtek, köztük a fibroblast, glia, emlő epithel sejtek osztódását. Szövettenyészetben alkalmazva csökkenthető a szerum mennyisége [23]. Az EGF biológiai aktivitása sokrétű, befolyásolja a sejtek proliferációs, regulációs és differenciálódási folyamatait. Sejt szinten serkenti az ion transzportot, növeli az endogén fehérje foszforilációt, változást okozva ezzel a sejt morfológiában és serkenti a DNS szintézist. A petefészekben csökkenti az FSH granulosa sejtek differenciálódására kifejtett hatását. Az EGF a TGF $\beta$ -val együtt gátolja a granulosa sejteknek cAMP indukálta LH-receptor expresszálo képességét [105]. A sertés petesejtek in vitro maturáltatásakor a sejt magérés elősegítése mellett hat a citoplazma megfelelő fejlődésének biztosítására is [4, 37]. Egér embriók in vitro fejlődését biztosító táptalajhoz adva úgy tapasztalták, hogy nagyobb volt a két sejtes embriók blastocystává fejlődésének aránya, és hatott a blastocysta összsejtszámának növekedésére is [48, 146]. Az EGF stimulálta a blastocysta aminosav felvételét és beépülését [102, 208].

TGF: Átalakító növekedési faktor



A TGF $\beta$  egy 25 kDa molekulásúlyú dimer. Két fehérje láncból áll, melyet egy diszulfid híd kapcsol össze. A 112 aminosavat tartalmazó monomer egy 390 aminosavból álló inaktív lánc proteolitikus bomlásával jön létre. Nem teljesen tisztázott, hogy a TGF $\beta$  serkenti vagy gátolja, vagy serkenti és gátolja, vagy nem hat a sejtosztódásra. Igazolták, hogy a legtöbb epitheliális sejt növekedését gátolja szövettenyészetben, de egyes mezodermális sejtek szaporodását serkenti. A petefészekben mind a granulosa, mind a theca sejtek termelik. A granulosa sejtek érése magában foglalja a cAMP termelést, a szteroidgenézist és az LH receptorok számának növelését és úgy tűnik, hogy ezekre a folyamatokra a TGF $\beta$  hatása kettős. A TGF $\beta$  alacsony FSH szint mellett serkenti a granulosa sejtek és LH receptorok termelődését, míg magas FSH szint mellett szelektíven gátolja azokat. A TGF $\beta$  serkenti az EGF receptorok számának emelkedését, és ezzel befolyásolja az EGF granulosa sejtek differenciálódására kifejtett gátló hatását [105].

NGF: Idegi növekedési faktor

Az NGF izolálása először 1953-ban egér sarcoma sejtekből történt [113]. Mayerhofer [126] igazolta, hogy a tüszőrepedést megelőző órákban jelentős növekedés tapasztalható a trkA (az NGF tirozinkináz receptora) és az NGF génexpressziójában a theca sejtekben. Azt, hogy a trkA receptor specifikus aktivitást mutat az NGF kötésére Kaplan [100] igazolta. Természetesen először azt gondolták, hogy az NGF csak a központi és perifériás idegrendszer sejtjeire hat [118], de egyre nyilvánvalóbbá vált, hogy a trkA receptoroknak az NGF közvetítette aktiválása nem neurális sejtekre is hat, jelentős szerepe van az endokrin és immunrendszeri sejtek differenciálódási és proliferatív folyamataiban [42, 81, 130, 177]. A pontos hatásmechanizmus, hogy az NGF miképpen befolyásolja a nem neurális sejteket, egyelőre ismeretlen. Annyit tudunk, hogy az NGF-trkA rendszer a theca externa

sejtjeiben hat [126], ennek hatására kezdődik meg a folliculus fal degradációja, és valószínű ekkor kezdődik meg a nyugalmi fázisból a proliferatív fázisba való átlépés, tehát az NGF-re való válaszadás kiterjedése [38]. Valószínű, hogy az NGF paracrin regulátora az ovulációs folyamatnak. Az NGF–trkA regulációs komplex ovulációs folyamatban való részvétele újabb bizonyítéka a neuroendokrin integrációnak [126].

FGF: Fibroblast növekedési faktor

Eddig számos különböző FGF-t izoláltak, melyek jelentős szerepet játszanak a szervezetfejlődési, sérülésreparálási, vérsejt előállítási és tumorogenezises folyamataiban. Szerepük nem korlátozódik a fibroblast sejtekre, hanem számos sejttypusban befolyásolják a mitózis, kemotaktikus, idegi és vérsejtképző aktivitást. Egyik fajtája az FGF2 elősegíti a granulosa sejtek mitózisos osztódását, gátolja differenciálódásukat és szabályozza a theca sejtek szteroidgenézisét. Az ösztadiol és androsztendiol kiválasztást csökkenti, de a progeszteron termelést nem befolyásolja [105].

### ***B 5. RELAXIN***

A relaxin egy dimer AB láncból álló peptid, melyet diszulfid hidak kapcsolnak össze, és amelyet a sárgatest és a placenta termel. Szerkezetileg az inzulinhoz hasonló, de kevesebb, mint 20% az aminosav homológia a kettő között. A hormon hatása és működési mechanizmusa 50 évvel ezelőtt ismert volt, de csak 1970 körül találták meg a relaxin génjét. A relaxin feladata, hogy hatására a nyakcsatorna és a hüvely ellazul, csökkenti a méhizomzat tónusát és a méh spontán összehúzódásait. Így megkönnyíti a magzat áthaladását a szülőutakon, valamint elősegíti az emlő mirigyek fejlődését is. A relaxin hat más szervrendszerekre is, pl. hám és emésztőrendszer. Kétféle relaxin létezik a relaxin H1, melyet a decidua és a placenta termel és a relaxin H2, amelyet a menstruációs ciklus corpus luteum-a és a

vemhességi sárgatest termel. A szérumban a relaxin szintje nő az LH hullám után a ciklusban. Bár a relaxin abszolút szintje alacsony, a vemhesség első harmadában éri el a legmagasabb szintet és utána csökken az ellésig. A ciklus alatt a relaxin termelést az LH stimulálja, míg a vemhesség alatt a hCG [212].

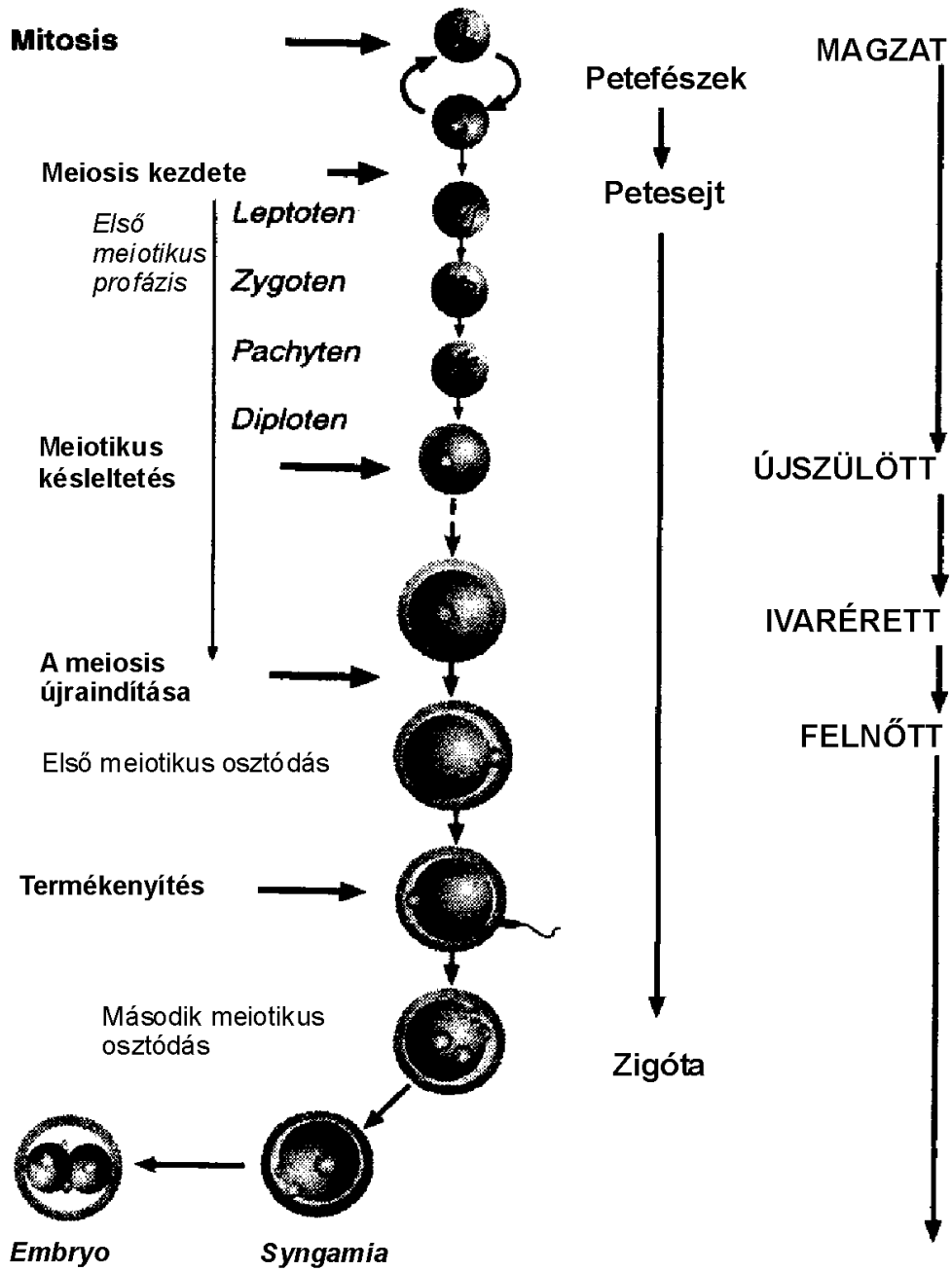
## *II. A PETESEJT*

A szervezet legnagyobb sejtje, mert tárolnia kell azokat az információkat és tápanyagokat: fehérjéket, szénhidrátokat és lipideket, melyek a zigóta kialakulásához és a korai embriófejlődéshez szükségesek. Az emlős petesejt aránylag kevés szikanyagot tartalmaz, méretük 50-250 $\mu$ . A kétélűek és madarak tojása sokkal több szikanyagot tartalmaz, méretük néhány mm-től több cm-ig terjedhet [169]. Von Baer 1825-ben megállapította, hogy a petesejt az öt körülvevő szomatikus sejtekkel együtt egy funkcionális egységet alkot, amelyet tüszőnek nevezünk. Az emlősökben a petesejt fejlődése, melyet oogenezisnek nevezünk a korai magzati életben kezdődik és hónapokkal vagy évekkel később az ivarérett korban fejeződik be (5. ábra).

### **I. A PETESEJT NÖVEKEDÉSE ÉS FEJLŐDÉSE**

#### **Citoplazma**

A növekvő emlős petesejt térfogata 250-300-szorosára nő. Jelentős változások következnek be a sejt ultrastrukturájában, a sejtorganellumok szerveződése megváltozik, és néhány új organellum (corticalis granulumok, zona pellucida) jelenik meg.



5. ábra. Oogenezis (Stömstedt, 1999 nyomán) [184]

A mitokondriumok számának növekedése és a Golgi apparátus szerkezeti változása nagyfokú. A riboszómák abszolút mennyisége 3-4-szeresére növekedik a citoplazmában, de relatív mennyiségük csökken. A legtöbb RNS szintézise és bomlása viszonylag lassú a citoplazmában és a meglévő RNS-ek élettartama szokatlanul hosszú. A szerkezeti fehérjék és enzimek szintézise és raktározása folyamatos a petesejt növekedése alatt és élettartamuk az RNS-ekhez hasonlóan nagyon hosszú. A petesejt növekedés későbbi fázisában fejlődik a mikrotubulusok és a filamentumok azaz a tubulin és aktin hálózata, a Golgi apparátusból és a szemcsés endoplazmatikus retikulumból kialakulnak a corticalis granulomok. Már az elsődleges folliculusokban kialakul a zona pellucida [201].

### **Mitokondriumok**

A petesejt fejlődése során nem csak a mitokondriumok száma és hozzá kapcsolódó sima endoplazmatikus retikulum mennyisége nő jelentős mértékben, hanem szerkezetük is jelentős változáson megy keresztül. A kis oocyták (20  $\mu$ ) sok hosszúságú mitokondriumot (1,5 $\mu$ ) tartalmaznak, melyben számos keresztirányú crista található. A teljesen kifejlődött petesejt számos gömb vagy ovális alakú mitokondriumot tartalmaz, melyek vakuolizáltak és a cristák ívesen vagy koncentrikusan helyezkednek el [189, 202].

### **Golgi complex**

A petesejt fejlődése során a Golgi complex drámai változáson esik át, amely jelzi működésének intenzitásában bekövetkező nagyfokú változást. A kis petesejtekben a Golgi complex membránjai lapos zsákoknak tűnnek kevés hólyaggal, vagy granulummal. A petesejt növekedés késői fázisában a Golgi membránok száma megnövekedik a lamellák egymáshoz viszonyított távolsága szintén nő, számos vacuolum, granulum, zsírcsepp kapcsolódik a membránokhoz. A Golgi apparátus

részt vesz a zona pellucida glikoproteinek kiválasztásában és a corticalis granulomok kialakításában. A fertilizáció után nagyfokú a Golgi membránok csökkenése és növekedik a kis membrán vesiculumok száma [189, 202].

### **Corticalis granulomok**

A corticalis granulomok kicsi, kör alakú, membránhoz kötött organel-lumok és a termékenyítetlen petesejt felületi részén találhatóak [73,175]. Átmérőjük 0.1-0.5  $\mu$  között változik és a késői petesejt fejlődés során keletkeznek a Golgi complexből. Mucopoliszacharidokat, proteázokat, szöveti plazminogén aktivátorokat szerin proteáz aktivitással, savas foszfatázokat és peroxidázokat tartalmaznak. Jelentős szerepet játszanak a polispermia megelőzésében a fertilizáció folyamatában [184].

### **Zona pellucida**

A zona pellucida (ZP) egy viszonylag vastag extracelluláris köpeny, amely körülveszi az emlős petesejtet, a petesejt fejlődése során jelenik meg, és a petesejt átmérőjének növekedésével arányosan nő a vastagsága. Állatfajtól függően vastagsága 7-12 $\mu$ , a kisebb vírusok és a makromolekulák számára átjárható. A nem fejlődő petesejt felszínén nem találunk ZP-t. A ZP fehérjék megjelenése a petesejt membránja alatti (perivitellinális) térben jelzi a petesejt növekedésének kezdetét. Először vékony fonalak jelennek meg a petesejt és a tüszősejtek között. Ezek a fonalak egyenletes vastagságúak és néhány mikron hosszúságúak. A növekedés során egy vastagodó filamentum hálózat alakul ki, mely keresztfonalakat is tartalmaz. Végül a ZP teljesen körülveszi a petesejtet és elválasztja a szomatikus sejtektől. Azonban a kapcsolat a petesejt és a tüszősejtek között továbbra is megmarad a petesejt microvillusok és a folliculus sejtekből a zona pellucidán áthaladó nyúlványokon keresztül [71]. A zonanak fontos szerepe van a fertilizáció alatt és után. A ZP tartalmaz spermium kötőhelyeket, amelyek részt vesznek a

sperma-petesejt interakcióban, amely a fertilizáció első lépése. Fontos szerepük van a fertilizáció utáni másodlagos polispermia elleni blokk kialakításában [49].

### **Sejtmag**

A sejtmag vagy más néven germinális vesiculum átmérője a petesejt átmérőjének növekedésével párhuzamosan alakul az érett petesejtben 20-30  $\mu$ . A citoplazma/sejtmag arány viszont megváltozik 8:1 helyett 64:1. A fejlődő petesejtben a sejtmagvacska vacuolizált és granulumokat tartalmaz, mivel a növekedés során intenzív riboszomális RNS szintézis folyik, az érett petesejtben a magvacska kompakttá, inaktívvá válik [184].

## **2. A MEIÓZIS ÚJRAINDÍTÁSA**

A petesejt növekedése alatt az emlős petesejt az első meiotikus osztódását felfüggeszti és az első meiotikus osztódás I. profázisában marad az ivarérettségig, amikor a preovulációs LH hullám hatására stimulálódik. Ekkor bekövetkezik a mag membránjának feloldódása a kromoszómák kondenzálódnak és a felfüggesztett meiózis az első metafázisig lezajlik. A homológ kromoszómák szétválásával az egyik garnitúra a kiváló sarkitestbe kerül, míg a másik az oocytában marad. A meiózis folyamata ismét megáll, és nem fejeződik be addig, amíg a fertilizáció nem következik be. A meiózis célja kettős: a kromoszómák mennyiségének redukálása haploiddá és a genetikai információ rekombinálódásának biztosítása. Csak azok a petesejtek, amelyek keresztülmennek ezen az érési folyamaton és a meiózis metafázis II állapotában vannak képesek a termékenyülésre és az azt követő normális embriófejlődésre [184].

### **Maturációs Promoter Factor (MPF)**

A maturációt elősegítő faktort először kétéltűekben írták le, a citoplazmában megjelenő enzimaktivitást, amely indukálja a GV (germinalis vesiculum) lebomlását. A későbbiekben igazolták az MPF univerzális regulátor szerepét az élővilágban, az élesztőtől az emlősökig irányítja a sejtciklus G<sub>2</sub> M fázis közötti átmenetet mind a mitózisban, mind a meiózisban. Az MPF két proteint tartalmaz a protein kinázt és a ciklint. Az MPF aktivitása a protein kináz foszforiláltságától függ. Aktív MPF szükséges a kromoszómák kondenzálódásához és a citoplazma reorganizációjához. Az MPF aktivitás a meiotikus érés során jelenik meg, legmagasabb a meiózis I. és II. metafázisában, és csökken az I. és II. anafázisban [184].

### **Ciklikus Adenozin Monofoszfát (cAMP)**

Az a tény, hogy ha a petesejtet a tüszőből eltávolítjuk megindul a mitózis, azt jelzi, hogy a folliculáris folyadékban olyan anyag van, amely gátolja ezt a folyamatot. Számos tény támasztja alá, hogy a cAMP tartja fenn a petesejt meiotikus késleltetését. A cAMP-t hidrolizáló foszfodiészteráz enzim blokkolása gátolja az izolált petesejtek spontán meiózisát, ugyanúgy, mint a tüszőben levő petesejt gonadotropin indukálta meiózisát. A cAMP kisebb koncentrációban fenntartja a meiózisos késleltetést, míg magasabb koncentrációban közvetíti a gonadotropinok meiózist újraindító hatását. A gonadotropinok indirekt hatást fejtenek ki a meiózis megindításában, mivel ekkor nincsenek gonadotropin receptorok az oocytában. A protein-kináz-A közvetíti a cAMP hatását a sejtben foszforilálva a célfehérjét. A cAMP koncentráció függése magyarázható azzal a ténnyel, hogy a petesejtben csak PKA I. található, míg a cumulus sejtekben PKA I.-és II. Mivel a PKA I. szabályozó alegysége erőteljesebben kötődik a cAMP-hez, mint a PKA II. alegysége, így a cAMP alacsony szintje a PKA I. jelenlétét segíti elő, ezáltal fenntartva a meiózisos



késleltetést. A cAMP szint emelkedése az ovuláció idején, amit a gonadotropinok indukálnak a cumulus sejtekben a PKA II: szint emelkedéséhez vezet. Ez egy olyan jel megjelenését eredményezi, amely legyőzi a gátlást és a meiózis folyamata tovább folytatódik. Bár az LH tekinthető az újrainduló meiózis fiziológiai stimulátorának, in vitro körülmények között az LH és FSH is segíti a meiózis folytatását. Amikor izolált cumulus-oocyta complexet használnak csak az FSH aktív, ez azzal a ténnyel magyarázható, hogy a cumulus sejtek csak FSH receptorokat tartalmaznak, LH receptorokat nem. Csak a muralis granulosa sejtek tartalmaznak FSH és LH receptorokat is. Mindkét gonadotropin az intracelluláris cAMP szint növelésével hat. Amikor az LH szintje emelkedik a vérben, a granulosa sejtekben emelkedik a cAMP szint. Valamilyen módon ez a cumulus sejtekben is cAMP szint emelkedést eredményezi, vagy az FSH közvetlen hatásával ezekre a sejtekre vagy a cAMP transzportjával a muralis granulosa sejtekből a cumulus sejtekbe a sejtek közötti közvetlen kapcsolatokon keresztül [184].

### **Purinok**

Számos kísérlet azt igazolja, hogy a hypoxantin, nagyobb mértékben, mint egyéb purinok és pirimidinek, szerepet játszik a meiózisos késleltetésben. Hypoxantin számos emlős tüszőfolyadékában elég magas koncentrációban van jelen ahhoz, hogy fenntartsa a meiotikus késleltetést. A hypoxantin metabolizmusa a cumulus-oocyta complexben elsősorban az inozitol monofoszfát adenzin képződéséhez vezető anyagcsere úton zajlik. Az adenzin hatása a meiotikus késleltetésre elhanyagolható, számos eredmény arra mutat, hogy a hypoxantin a felelős ennek az állapotnak a fenntartásáért. A hypoxantin valószínűleg a foszfodieszteráz gátlásán keresztül hat [184].

### **Meiózist indukáló szterinek**

Az egér cumulus sejtek az FSH hatására kiválasztanak egy meiózist indukáló anyagot a forskolin vagy dibutilil cAMP-t. Bár a hatás szempontjából lényeges, hogy a cumulus oocyta komplex ép legyen a képződött anyag diffúz úton kerül a cumulus sejtekből a petesejtbe, átjutásához nincs szükség szoros kapcsolódás (gap junction) jelenlétére. A meiózist indukáló anyagot emberi petefészek folyadékából ugyanúgy kimutatták, mint bika heréből és két különböző, de egymással rokon szterinként azonosították, mindkettő a koleszterin bioszintézis köztterméke. A gonadotropin stimulálja annak az enzimnek az aktivitását, amely termeli a meiózis indukáló szubsztrátot (MIS)-t. Ez a két szterin serkenti a csupasz hipoxantin által késleltetett petesejtek meiózisát csakúgy, mint a cumulus oocyta komplexekét. A szterinek hatásmechanizmusa még nem ismert [184].

### **A kalcium szerepe a meiózisban**

A gerinctelenekben és alacsonyabbrendű emlősökben a mitózis és meiózis fontos lépései előidézhetők az intracelluláris kalcium szint emelésével. Az is ismert, hogy a szarvasmarhából származó cumulus oocyta komplexet LH-val indukálva a petesejtben kalcium oszcillációk figyelhetők meg, de a különböző emlősök nem egyformán reagálnak ebben az esetben. Az a tény vitathatatlan, hogy a kalciumnak fontos szerepe van a meiózis metafázis I. sarkitást kilökődés folyamatában, valamint a fertilizációban [184].

## **3. AZ OVULÁCIÓ**

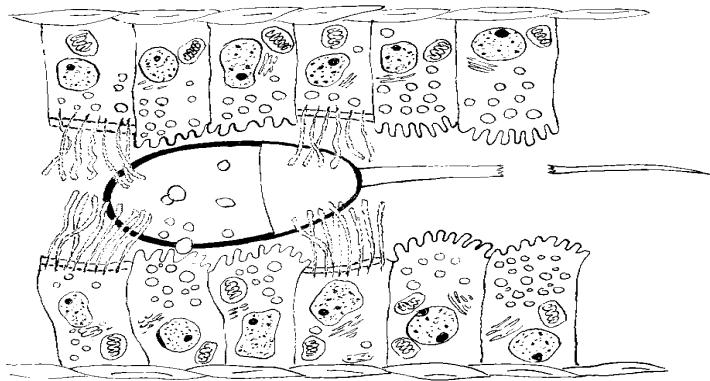
Az ovulációt a luteális fázis végi LH hullám váltja ki, amit a preovulációs folliculusok ösztrogén termelése indukál. Az LH hullám nemcsak a meiózis újraindítását és a magérést eredményezi, hanem a citoplazma valamint a zona pellucida éretté válását is. A citoplazmatikus érés magában foglalja a corticalis granulomoknak vándorlását és a petesejt felszín közeli elhelyezkedését. Az LH serkenti a muralis granulosa sejtek ösztrogén termelésének átalakítását progesz-teron termelésre (luteinizáció), ez utóbbi hormon válik a corpus luteum által termelt legfontosabb szteroiddá. Az LH serkenti a tüszőfal helyi progeszteron termelését és a fal enzimikus lebontását, amely a petesejt kiszabadulásához vezet kb. 36 órával később. A citokinek plazminogén aktivátor termelésével valamint a cumulus sejtek expanziójával serkenti a glükózaminoglikánok termelését. Az ovuláció előtt közvetlenül a petesejtek és a cumulus sejtek közötti gap junction eltűnik és a cumulus oocyta complex leválik a tüszőfalról. Amikor kiszabadul a folliculusból a cumulus oocyta complex a petesejt felszínéhez közel a petevezető ampulláris szakaszában annak redői között tartózkodik. A cumulus sejtek jelenléte segíti a petesejtet a redők csillóihoz való tapadásban. A petesejt életképessége az ovuláció után 12-24 óra [184].

#### **4. A SIKERES FERTILIZÁCIÓ FELTÉTELEI**

A spermiumoknak az ejakulációt követően a női nemi utakba kerülve át kell esniük egy sorozat biokémiai és funkcionális változáson mielőtt kapcsolatba lépnének az érett petesejttel és megtermékenyítenék [14]. Ezt a folyamatot „kapacitáció”-nak nevezzük [8]. A spermiumok kapacitációja hosszú, többlépcsős folyamat, amely magában foglalja a sperma membrán-proteineknek és a membrán

fluiditásának változását, valamint a spermiumok mozgékonyságának változását, jelentős növekedését, és végül elvezet az acrosoma reakcióhoz [213]. A spermium kapacitáció alatt végbemenő eddig ismert funkcionális változások a következők: az epididimális és/vagy szeminális plazma proteinek, amelyek az ejakuláció alatt adszorbeálódtak a sperma membránjához módosulnak és újjászerveződnek a petevezetőben az otlevő proteoglikánok (heparin, hyaluronan) hatására. A membrán lipid-(koleszterin) tartalmának változása vezet a membrán fluiditásának növekedéséhez. Ezen folyamatok hatására módosulnak a membrán ioncsatornái, leginkább a  $Ca^{2+}$ -csatornák, megnő az intracelluláris  $Ca^{2+}$  mennyisége és a pH [147], továbbá indukálódik a hiperaktív mozgékonyság [34]. Az albumint (a női nemi utak fő proteinjét) tartják a kapacitációt elősegítő egyik faktornak, amely hatását úgy fejti ki, hogy csökkenti a spermamembrán koleszterin foszfolipid arányát [66]. Úgy tűnik: a bikarbonátnak kulcsszerepe van a sperma membrán destabilizálásában [75, 193]. Ez a megfigyelés harmonizál azzal, hogy a bikarbonát szint alacsony a mellékhere farki részében, az ejakuláció alatt nagy mértékben nő, és magas szinten marad a női nemi utakban is [170].

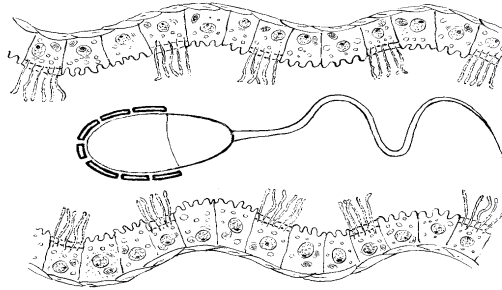
A háziállatoknál relatíve hosszú ideig tartó preovulációs periodus áll fenn, ezalatt az idő alatt képesek a párzásra (sertésben ez 40-42 óra). Ebből következően az ejakulált spermiumok a női nemi utakba kerülve a petevezető istmus régiójában hosszabb-rövidebb ideig tárolódnak (12-24 óráig). Ezt az ovuláció előtti tárolást a sperma rezervoárban több tényező biztosítja. Először is a sperma apikális végén az acrosoma ép és az epithelhez [154] kötődik vékony fehérjefilamentumokkal. Az istmus szekretoros sejtjei viszkózus, mucinózus szekrétumot (glikozamino-glikánokat) választanak ki és alacsony  $Ca^{2+}$  szintet biztosítanak, amely késlelteti a kapacitációt [185]. A spermiumok mozgása gátolt és a petevezető simaizomsejt-jeinek összehúzódásai kis mértékűek (6. ábra).



6. ábra: Spermium az ovuláció előtt a petevezetőben az epithelhez kötött  
(Hunter nyomán készítette Sótonyi L.)

Az ovuláció időpontja körül a helyzet megváltozik, valószínűleg a tüsző közvetlenül ovuláció előtt megkezdett progeszteron termelése befolyásolja a folyamatot oly módon, hogy a progeszteron a véráramon keresztül az istmus régió sejtjei által kiválasztott proteoglikánok összetételét megváltoztatja, a petevezető átmérője megnő, a simaizomtónus kifejezettebb [83, 84, 85], hatására a spermiumok mozgása hiperaktívvá válik és ez elősegíti, hogy az oviductus epithelhez kötött állapotuk megszűnjön [87] (7. ábra). A glükózaminoglikánok kapacitáció késleltető-elősegítő, fent említett szerepe még nem teljesen tisztázott, eddig főleg in vitro eredmények állnak rendelkezésünkre. Néhány in vivo kísérleti eredmény már igazolja az oviductus folyadék összetétel változás hatását a sperma transzportra az ovuláció időpontjában [164]. Mindezen bonyolult szabályozási rendszer azért szükséges, hogy az ampulla-istmus határon a termékenyítés időpontjában a spermiumok és az oocyták aránya közel 1:1-nek feleljen meg, ahogy ezt már több állatfajnál igazolták, így sertésnél is [85]. Ha ez nem így lenne, akkor sokkal nagyobb lenne a polispermia veszélye, mely azonnali embrió elhaláshoz vezet.

Az oviductus által kiválasztott glikoproteidek versengenek a spermiumokkal a spermakötőhelyekért a zona pellucida felszínén, és ez tovább csökkenti a polispermia veszélyét [93].



7. ábra: **Hiperaktív spermium a petevezetőben, az ovuláció időpontjában**  
(Hunter nyomán készítette Sótonyi L.)

A harmadik mechanizmus, mely a polispermia elkerüléséhez vezet a következő: az érett petesejt membránja alatt soliter helyzetben levő corticális granulomok exocitózisa következik be egyetlen spermiumnak a citoplazmába jutása után. A corticalis granulomok hidrolitikus enzim és szénhidrát tartalmukat a perivitellinális térbe juttatják, amely védőburkot alkot a petesejt felszínén, módosulnak a zona proteinek, oly módon, hogy a spermiumkötő helyek inaktiválódnak, így lezárul az út a további érett spermiumok bejutása előtt [28].

##### 5. A SPERMIUM EGYESÜLÉSE A PETESEJTTTEL

Miután átjutott a zonán, a spermium feje a petesejt plazma membránjához (oolemmához) kötődik és a spermium bejut az ooplazmába. A spermium farkban jelenlevő mitokondriumok degradálódnak és csak a petesejtben levő mitokondriumok jutnak át a következő generációba. Csak azok a spermiumok, amelyek átestek az akrosoma reakción képesek fuzionálni az oolemmával. A fúzió

után azonnal a membrán hiperpolarizálódik és sorozatos Ca oszcillációk kezdődnek. Az első intracelluláris Ca szint emelkedés a spermium behatolása után 10-30 másodperc múlva történik és az oszcilláció kb egy órán keresztül folytatódik ezután. A spermiumnak azt a fehérjéjét, amely a Ca oszcillációt megindítja mostanában azonosították. A fertilizáció megtörténtének korai jele a corticalis granulumok exocitózisa [31]. Ez néhány perccel a spermium bejutás után kezdődik, és szakaszosan folyik. A Ca oszcilláció szükséges az exocitózis beindulásához. [196].

A bejutott spermium nukleáris DNS-e dekonzenzálódik és megkezdődik a sperma protamin kicserélődése a petesejt által termelt hisztonokra. Ezalatt megtörténik a petesejt metafázis II. telofázis II. osztódási szakasza, a női pronucleus kialakulása [5]. A petesejt aktiválódás nemcsak a corticalis granulumok felszínre kerülésében, a sejtosztódás folytatásában nyilvánul meg, hanem abban is, hogy a citoplazmában más fehérjék termelése kezdődik meg, mint a fertilizáció kezdete előtt [40].

### **III. EMLŐS EMBRIÓFEJLŐDÉS A MEGTERMÉKENYITÉSTŐL A MEGTAPADÁSIG**

#### **1. Osztódás morula stádiumig**

##### ***Fénymikroszkópos vizsgálatok***

Az emlősöknél a női és hím gaméták zigótává való egyesülése nem jelenti a pronucleusok egy sejtbe diploiddá váló alakulását. A pronucleusok elkülönülten maradnak mindaddig, míg a magmembránjuk feloldódik és az anyai és apai kromoszómák keverednek [168]. Azt feltételezték, hogy ovuláció után a petesejten maradó corona radiata sejtek hamarosan disszociálnak a zona pellucida felületéről [30]. Ma már tudjuk, hogy ez a folyamat sokkal lassabban zajlik le. A zona pellucida alapvetően szükséges az emlős embriók normális fejlődéséhez egészen a teljesen

kompaktizálódott késői morula stádiumig [191]. Nyilvánvaló a zona pellucidának azon funkciója, hogy a blastomereket együtt tartja, de valószínűsíthető az is, hogy szerepe van abban, hogy konzerválja a perivitellináris tér mikrokörnyezetét [46].

A nem szuperovuláltatott és a szuperovuláltatott szarvasmarhánál egyaránt úgy találták, hogy a zigóta két blastomerre való osztódása aránylag gyorsan bekövetkezik, rendszerint 24-28 órával az ovuláció után [132]. In vitro fertilizáció estében azonban az első osztódás rendszerint 44 (legkorábban 33) óra múlva következik be [179].

A somatikus sejtekre jellemző sejtciklus (M, G<sub>0</sub>, G<sub>1</sub>, S, G<sub>2</sub>) más a korai embriók esetében mivel a nucleus citoplazma arány csak mintegy 120 sejtés korban éri el a kifejlett kor értéket [181]. Juhoknál a korai osztódások rövidebbek, különösen a G<sub>2</sub> és M fázis az első osztódás során [173]. In vivo a második sejtosztódás a 2. napon kezdődik. A második osztódás kezdetekor egyes blastomerek egy egész sejtciklussal megelőzhetik a másikat, így az osztódás aszinkron megy végbe. Azok a sejtek, melyek korábban osztódnak, az inner cell mass (ICM) sejteket adják [44].

Azon kívül, hogy az osztódások kezdete nem esik egybe, a blastomerek nem két egyenlő részre osztódnak, így az egyik leánysejt általában nagyobb, mint a másik [119]. Ez a jelenség az embriófejlődésben is különbséget hoz létre, az egérnél a nagyobb sejtek rendszerint a „külső” sejteket, míg a kisebb sejtek a „belső” sejteket adják [219]. A „külső belső” hipotézisnek köszönhetően a blastomerek két csoportra oszthatók: ICM és trophoctoderm (gyakran trophoblast ectodermnek hívják), mely utóbbi, amikor kiegészül az endodermával a trophoblastot alkotja [127].

Az in vivo embrióknál viszonylag nagy a perivitellináris tér, a nyolcsejtes morulák blastomerjei aránylag szabályosak, míg az in vitro fejlődő zigótában a perivitellináris tér rendkívül kicsi, a 8-sejtes morula blastomerjei nem szabályosak [155].



Közvetlenül is megfigyelhetők, hogy mely sejtekből alakulnak ki az ICM sejtek. Négy és nyolcsejtes embriók elkülönített blastomerjeit hozták össze, un. háromnyolcad embriókat állítottak elő. Megfigyelték, hogy túlnyomó részben a jobban fejlett és kisebb blastomerekből (nyolcsejtes) lettek az ICM sejtek [44].

16 sejtes állapotig az embriókat a sejtek száma alapján csoportosítják, ezután csak morulának nevezik őket, ezt a fejlettséget fajtól függően a 3.(pl. juh, sertés), vagy az 5.(pl. szarvasmarha) napon éri el az embrió. Erre az időpontra a legtöbb embrió az oviductusból az uterusba vándorol. Az egyes blastomerek elvesztik éles kontúrjaikat, az un. compactizáció folyamatán esnek át. Ez nem irreverzibilis átalakulás, mert mindkét irányban lejátszódhat, tehát decompactizálódás és recompactizálódás egyaránt lehetséges. A compactizáció a blastocoel létrejöttének előfeltétele. Ez a folyadékkal telt üreg általában a 7. napon jelenik meg szarvasmarhánál (juhnál, sertésnél az 5. napon) jelezve compact morula korai blastocystává alakulását [10].

### ***Transzmissziós elektronmikroszkópos vizsgálatok***

A koraembriók blastomerjei erős kontúrokkal vannak körülvéve, kivéve ahol egymáshoz érnek. A két- négysejtes állapotban plazmamembránjuk microvil-lusokkal fedett. Nyolcsejtes állapotban átmeneti fókuszos kapcsolat jön létre a plazmamembránban, amely lencseszerű extracelluláris térrel van elválasztva, tizenhat sejtes állapottól nehéz meghatározni a kapcsolódás fajtáját. A blastomerek összetömörülése, mely a compactizációkor bekövetkezik, Ca függő folyamat, így a sejtek viszonylag könnyen szétválaszthatók in vitro körülmények között Ca mentes közegben [90]. Az előbbieket mellett az intracelluláris cytoskeletonális rendszer is fontos főleg a mikromanipuláció szempontjából (pl. egy blastomer felszíni károsodás nélkül felszívásához). Ehhez olyan ágensek, mint a cytochalasin B (mely relaxálja a cytoskeletonális rendszert) használata elengedhetetlen [173].

A középtest, mely az osztódási barázda maradványa, megtalálható a két blastomer között. Ez azt jelzi, hogy mechanikus kapcsolat állhat fenn a leánysejtek között egy bizonyos ideig, valószínű két sejtciklusig. Centriolumokat nem lehet nyolcsejtes állapot előtt megfigyelni [68]. Az osztódási folyamatban levő blastomerek citoplazmája úgy jellemezhető, hogy számos nagy vesiculum található benne, igen nagy zsírszemcsék, primitív „fedett” mitokondriumok, amelyek néhány perifériális lemezt tartalmaznak, és organelum mentes zona helyezkedik el a citoplazma corticalis részében. A mitokondriumok a sima endoplazmatikus retikulummal állnak kapcsolatban. Riboszómák és poliriboszómák a sejt különböző részein megtalálhatók, míg a Golgi hólyagok és lemezek csak a sejtmag szomszédságában [30]. A sejttagon belül a magvacskák összetömörödtek a korai osztódási fázisok idején, de nyolcsejtes állapotban vacuolizálttá válnak és elvesztik compact szerkezetüket a juhnál és szarvasmarhánál [107].

A sertésnél a korai embriók magvacskái szintén összetömörödtek. Miután a sertés embrió négysejtes állapot után már megkezdődik az aktív rRNS (riboszomális RNS) szintézis, a magvacskák szerkezete vagy vakuolizált, vagy esetleg átmeneti, azaz vakuolizált és compact változat egy magvacskán belül észlelhető [156]. A compactizáció folyamatát ultrastrukturális változások kísérik. A blastomerek és a citoplazmán belüli alkotórészek elvesztik gömbalakjukat. Amint a mitokondriumok elvesztik „fedett” megjelenésüket, keresztlemezek kezdenek kialakulni. A compactizálódó morula külső sejtjei polarizálódni kezdenek, mely folyamat odáig vezet, hogy jól látható különbség figyelhető meg minden sejt külső és belső fele között. A szarvasmarha embrióban ezeknek a polarizált sejteknek az oldalsó plazmamembránján nincsenek mikrovillusok, viszont apikálisan szoros kapcsolódás van, amely valószínű részt vesz a blastocoel üregének és belső miliójének kialakításában. A szoros kapcsolódás miatt a compact morula sejtjeit rendkívül nehéz mechanikailag szétválasztani [30].

## ***Fiziológia***

A korai embrió osztódásai során a különböző funkciók irányítása átkerül az anyai genomból az embrionális genomba. Szarvasmarhában és juhban ez a folyamat valószínű a nyolcsejtes embrió tizenhat sejtes embrióvá osztódása közben zajlik le. Ezt a tényt a nucleolusok citológiai és ultrastrukturális vizsgálatával állapították meg [107]. A nyolcsejtes embriók rRNS és hnRNS vizsgálatával szintén igazolták [153]. Kecskénél és egérnél úgy találták, hogy mindez kb. a kétsejtes, sertésnél négysejtes állapot körül zajlik le. Egérben a négy és nyolcsejtes állapotban az anyai mRNS már nem íródik át [103]. Túlságosan leegyszerűsített lenne azonban az embrionális fejlődést szabályozását úgy tekinteni, hogy mielőtt az embrionális genom aktiválódik, azt megelőzően teljesen anyai szabályozás alatt áll. Pronucleus állapotban levő egér zigóták manipulációs kísérleteivel igazolták, hogy a spermiumból származó kromoszómáknak, nemcsak annyi feladata van, hogy velük együtt kialakuljon a zigóta diploid szerkezete, hanem a hímre jellemző „imprinting” (amely a spermatogenezis alatt kialakul) közvetítése is. Úgy tűnik ez alapvető eleme a normális embriófejlődésnek [187]. A kromoszómák a szülői eredetre „emlékeznek” az egyedfejlődés során és kifejlett korban is [131].

Csak a korai osztódási periódus alatt aktív mindkét X kromoszóma a nőivarú embriónál, ezután egyik inaktiválódik. Ez a folyamat az első két hét alatt lejátsszódik a szarvasmarhánál és közel hasonló idő alatt a lónál is [171]. A második X kromoszóma inaktiválódása előtt, tehát a nőivarú embriókban kétszer annyi aktív X kromoszóma gén van, mint a hímekben, mely metabolikus tesztekkel mérhető és az embrió ivara megállapítható [206]. Ma általánosan alkalmazott az Y kromoszóma meghatározása PCR-rel.

Egérből izoláltak olyan gént, mely az implantálódás előtti embrió fejlődését meghatározza ez a Ped gén (Preimplantation embryo development) [200]. Ide tartozik még egy érdekes megfigyelés, hogy az osztódás gyorsabb a hímivarú, mint a nőivarú egérben [192].

Az is fontos kérdés, hogy az anyai vagy az embrionális genom irányítja-e az embrió anyagcseréjét már az egyedfejlődés kezdetén is. Minden sejtosztódáshoz szükséges a megkívánt anyagcseretermékek és energiaforrások biztosítása, tehát az embrió „tud a saját megtermékenyüléséről”. Ez az ún. Early Pregnancy Factor (EPF) azaz a korai vemhességi faktor, melynek ismerete lehetőséget biztosítana a haszonállatok korai vemhességi diagnosztikájában [141]. Izoláltak egy foszfogliceridet PAF (Platelet Activating Factor), amelyet a koraembriók termelnek. A PAF elengedhetetlenül szükséges egérben a vemhesség kifejlődéséhez és az EPF expresszióját indukálja [144].

Igazolták, hogy a foszfolipid szintézis az első osztódás után minimális, ekkor a membránfelületek és sejtorganellumok száma nem nő jelentős mértékben. A foszfolipid szintézis a következő sejtosztódások és a compactizáció folyamán azonban a 9-13-szorosára emelkedik. Ezalatt a plazmamembrán felületek megkettőződnek és minden sejtben a sejt organellumok száma lényegesen emelkedik [157].

## **2. Blastocysta stádium, hatching, beágyazódás előtti elongáció**

### ***Fénymikroszkópos vizsgálatok***

A korai blastocysta stádiumban az embrió kb. 100 sejtből áll, amelybe beletartozik a lencse alakú ICM és a trofectoderma, mely körülveszi az ICM-et és a blastocoelt. A trofectoderma minden sejtjében folyik a mitózis és az ICM fölötti sejtek később degenerálódnak. A közepesen fejlett blastocysta mintegy 120 sejtet

tartalmaz, majd a teljesen expandálódott blastocysta 160 sejtet a hatching (kibújás) időpontjában. Ekkor a blastocoel üreg majdnem teljesen kitölti a zonát. A trophoctoderma és az ICM sejtek közvetlenül a zona alatt vékony rétegben helyezkednek el [151]. A hatching aktív folyamat. A szarvasmarha embrióban kimutattak egy enzimet, mely képes a zona pellucida részleges feloldására és ezáltal elősegíti saját kibújását [129]. A kibújt blastocysta először még gömbalakban növekedik tovább, kb.1000 sejtés állapotban a sejtek kevesebb, mint 25% ICM sejt. Megközelítőleg ekkora nagyság elérésekor a kibújt blastocysta reexpandálódik és az ICM sejtek kidudorodnak, a külső felszínre kerülnek, ezáltal a tisztán látható embrionális csomót alkotják. Ekkor még fedettek trophoctoderma réteggel (Raubert's layer) kb. 10-12. napig. A gömbalak átmenetileg oválissá válik, mielőtt a jól látható megnyúlás a 12-14. napon megkezdődik [15].

Az elongáció kezdete és mértéke nagyon eltérő az egyes fajoknál. Juhnál igazolták, hogy mely méh faktorok hatnak az elongációs folyamatra [47]. A sertés blastocysta hossznövekedése rendkívül gyors. A 10-12. nap között a horizontális növekedés 30-35 mm óránként [65]. Mindezzel összefügg, hogy a 12-18.nap között történik meg az életképes embriók 75%-nak elvesztése [51]. Az intenzív növekedés miatt nyilvánvaló, hogy az uterus kapacitása és nem az ovulációs ráta befolyásolja legnagyobb mértékben az alomszám nagyságát sertésnél. Mindezt igazolták a kínai meishan sertéssel végzett vizsgálatok, amely köztudottan 3-5 malaccal nagyobb alomszámot produkál, mint az európai vagy amerikai tett kereskedelmi fajták. A meishan embriók trophoctodermája kisebb mitotikus aktivitást mutat, az elongáció kisebb mértékű, mint a többi tenyésztett fajtánál [50]. A másik végletet képviseli, hogy egyes patások, mint pl. az őz képesek a kibújt blastocystát hónapokig „téli álomban” tartani [6].

### *Szövetteni és elektronmikroszkópos vizsgálatok*

A szarvasmarha embriók szövetteni vizsgálatokor megállapították, hogy az endoderm sejtek az ICM sejtek alól szétterjednek a 8. naptól kezdve és a 10. napra teljesen befedik a köbös és poligonális sejteket, melyek a blastocoelt veszik körül, így alakul ki a trophoblast. Az endoderm sejtek vékonyabbak, mint a trophoctoderm sejtek, különösen az embrió alatt. A szétterjedésükben valószínű szerepet játszik egy acelluláris matrix, amelyen a sejtek megtapadnak mozgás közben. A mesodermális sejtek, melyek szintén különböznek az ICM sejtektől a 14-16. napon szétterjednek a trophoctoderma és az endoderma között, és két réteget alkotnak. A mesoderma külső rétege és a trophoctoderma alkotják a choriont, míg a belső réteg és az endoderma a szikzacskó falát. A két mesodermális réteg közötti teret coelomnak vagy egzocoelnek hívják. Később ebből ered az allantois, de csak a 20. nap után [92]. Minthogy a mesoderma expanziója fokozatosan történik, az elongált blastoderma veziculum különböző részei a 14. naptól különböző sejtkeponenseket tartalmaznak. Trophoblast vesiculumok készítésénél figyelniük kell arra, hogy anyagcsere termékeik eltérnek attól függően, hogy milyen a sejtfelepítésük. A trophoctoderma a compact morula külső sejtjeinek a polarizációjával jött létre, és a blastocysta első differenciálódott epitheliumát alkotja, melynek plazma membránja a következő alkotórészekből áll: apikálisan a felszín microvillusokkal fedett, oldalt tight junction (szoros kapcsolódás) complex található desmosomákkal és interdigitális kapcsolódással, bazálisan az endoderma differenciálódása előtt sima a membrán, kivéve egy-két nyúlványt, amely a blastocoelbe nyúlik. A trophoctoderma citoskeletális keponenseket tartalmaz, amely tipikus az epitheliális sejtkeknél. Ezekben található köztes filamentum kötegek (tonofilamentumok), amelyek egyik desmosomától a másikig futnak a citoplazmán keresztül, bőségesen tartalmaznak microfilamentumokat a microvillusokban és a corticalis citoplazmában, ezen kívül microtubulusokat, melyek keresztül haladnak a citoplazmán és kötegeket alkotnak.

Később ezekben figyelhető meg leginkább a mitotikus aktivitás. A trophoctoderma sejtek felépítésének vizsgálatát monoklonális ellenanyagok felhasználásával végezték [47].

A trophoctodermális citoplazma a szokásos organellumokat tartalmazza: kereszt-lemezes mitokondriumok, riboszomák és poliriboszomák, szemcsés és sima endoplazmatikus retikulum és Golgi apparátus. A sok lisosoma és reziduális test jelenléte a citoplazmában arra utal, hogy az epitheliumban aktív transzport és fagocitózis van. A citoplazmában sok lipidcsepp is található, a magok kromatin tartalma periferiálisan helyezkedik el, ezen kívül perikromatikus vezikulumok és tipikusan aktív nucleolusok láthatók. A sejtszám némi csökkenése - a sejthalál (apoptózis) miatt - valószínű a normális fejlődés velejárója [21]. A trophoctodermával ellentétben, az ICM nyilvánvalóan nem epitheliális szerkezetű, nincsenek különböző kapcsolatok és nem találhatóak tonofilamentumok sem, mint az epithel sejteknél. A plazma membrán párhuzamosan halad, hosszú távolságon keresztül gap junction (rés kapcsolat) van a sejtek között, vannak kisebb területek, ahol a plazmamembrán elektrodensebb, mely valószínűleg szorosabb kapcsolódást jelöl. Az ICM hasonlóan kapcsolódik a trophoctodermához is. Microfilamentumok és mikrotubulusok láthatók az ICM-ben, amelyek később a magorsót alkotják a mitotikus sejtekben, mely folyamat meglehetősen gyakori az ICM sejtekben. A mitokondriumok és az endoplazmatikus retikulum az ICM-ben hasonló a trophoctodermához. A 12. napra az ICM külső sejtjei polarizálódnak embrionális ectodermára és az embrionális csomó felszíni epitheliumára. Ez a differenciálódás éppen azelőtt történik, mielőtt a Rauber's hárttyát elveszítené az ICM. Ennek eredményeként az ICM úgy látszik több sejtrétegből áll. Az endodermális sejtek lencse alakúak, így jól elkülöníthetők a trophoctodermális sejtektől. Az endodermális sejtek is epitheliálisak és az erre jellemző alkotórészek a desmosomákhoz kapcsolt tonofilamentumok és más cytoskeletális komponensek megtalálhatók bennük.

Szerkezetükben ezek a sejtek is polarizáltak. A trophoblast oldalon fókuszosan kapcsolódnak a bazális lemezhez, a blastocoel ürege felé eső oldalon pedig mikrovillusos a kapcsolat. Citoplazmájukban találhatóak mitokondriumok, sima és szemcsés endoplazmatikus retikulum, lisosomák, Golgi apparátus. Míg a legtöbb endodermális sejt lapos és üreges, az ICM alatti sejtek köbösek [125]. A szarvasmarha trophoblastra figyelemre méltó jellemzője, hogy bár a 12. napig egyáltalán nem tapasztalható, a 18. napon a sejteknek már 25%-a két nucleust tartalmaz [74].

### ***Fiziológia***

Kimutatták, hogy a 7 napos szarvasmarha embrióban a Krebs-Szentgyörgyi ciklus aktív, az Embden-Meyerhof kör gátolt, és a glükóz a pentózfoszfát ciklusban bomlik le. A 7 napos embrió fel tudja használni a glutamint, de a propionát, acetát és butirát ebben a fejlődési szakaszban nem jöhet szóba energiaforrásként. A hisztidin szintén képesek felhasználni, ez abból a szempontból érdekes, hogy a hisztamin valószínű szerepet játszik az embrió anyaméh kölcsönhatásban. A 13. naptól az Embden-Meyerhof anyagcsereút is működik. Nyilvánvaló, hogy a blastocysta minden sejt típusában aktív anyagcsere zajlik, erre utal a sejtekben található nagyszámú riboszóma és szemcsés endoplazmatikus retikulum jelenléte [167]. Feltételezték, hogy a kialakuló vemh valamilyen úton jelzést ad le az anyai szervezet számára. Valóban találtak juhok vizsgálata során egy alacsony molekulásúlyú savas proteint, oTP-I-nek ovine Trophoblast Protein 1-nek nevezték el. Hasonló funkciójú proteint találtak szarvasmarhánál is. Ezt bovine Trophoblast Protein-1-nek nevezték el. Ez a fehérje nagyobb molekulásúlyú, mint az oTP-1 és szignifikánsan bázikusabb és több izoformot tartalmaz [77]. Az oTP-1 hatásainak egyike, hogy változást okoz a prosztaglandin metabolizmusban [45]. Az oTP-1



másik lényeges hatása a fehérjeszintézis indukálása. Egy savas protein (Ms. 70000, pH 4.0) különösen érzékeny az oTP-1 jelenlétére, de általánosan elmondható, hogy szignifikánsan nagyobb a fehérjeszintézis a 13 napos vemhes juh méhében, mint a kontrollként vizsgált nem vemhesében [67, 174].

Az embrióban található számos lipidcsepp is mutatja a zsírok fontosságát az embrió fejlődésében, mind az anyagcserében, mind a szerkezeti felépítésben, membrán komponensként jelentősek. A blastocystában az össz mennyiségük a 7-10. nap között állandó és a 11. naptól növekszik, összetételükben is jelentős változás következik be, ugyanis a fejlettebb embriókban hosszabb láncú és telítetlenebb zsírsavak találhatók [128]. A 13. naptól a kibújt szarvasmarha embrió prosztaglandint termel, melynek szerepe még nem tisztázott, többek között az intercelluláris víz transzportban van jelentősége [115]. Más fajoknál valószínű a kibújás folyamatában is szerepe van a prosztaglandinnak [162].

#### IV. EMBRIÓTENYÉSZTÉS

##### 1. AZ EMBRIÓTENYÉSZTÉS TÖRTÉNETE

Az in vitro embrió előállítás állomásai a következők: A petefészek folliculusaiból kinyert éretlen petesejtek laboratóriumi körülmények közötti érlelése, azaz in vitro maturáció (IVM), az érett petesejtek termékenyítése kapacitált spermiumokkal, azaz in vitro fertilizáció (IVF), a zigóta fejlődésének biztosítása megfelelő kapacitációs feltételekkel, azaz in vitro development (IVD).

Az emlős embriók tenyésztésével először 1913-ban Bracket foglalkozott, aki nyúl blastocystát cultivált [17]. Ezt követően Lewis, majd Pincus foglalkozott nyúl embriótenyésztéssel különböző "természetes" közegeket használtak, mint a szérum vagy a plazma [114, 152].

Az *in vitro* embriókultiválási kísérletek akkor kezdtek igazán érdekessé válni, amikor egy "félleg meghatározott" közegben, amely egyszerű fiziológias sóoldatot tartalmazott borjú szérum albuminnal (BSA) és laktáttal kiegészítve, sikerült a kétsejtes egérembrío blastocystává való fejlődését elérni [203].

Ez a felfedezés indította meg a beültetés előtti emlős embrió vizsgálatokat. A későbbi munkák erre az egér embriótenyésztésnél használt egyszerű közegre összpontosítottak és ez alapján olyan eljárások fejlődése kezdődhetett meg, mint az embrió mélyhűtés, mikroszétosztás, kiméra és transzgénikus állatok létrehozása. Ezen eljárások mindegyike jelenleg is állandóan fejlődik [99]. Számtalan értékes kísérleti eredmény született egérembriók vizsgálatával. Nyilvánvaló, hogy az eredmények és tapasztalatok más fajoknál is felhasználhatók, de meg kell szívlelnünk Fehilly és Willadsen megállapítását: "Nincs semmi különösebb okunk arra, hogy azt higgyük, az egérembrío sokkal jobban hasonlít a szarvasmarha vagy emberi embrióhoz, mint amennyire az egér hasonlít a szarvasmarhához vagy az emberhez."

Számos kutatóhelyen Brinster [18] tenyésztési rendszerét használják, mely nem más, mint csepptenyésztés paraffin olaj alatt. A megfelelő vízminőség fontosságára hívta fel a figyelmet Chapman [24]. Kétszeresen desztillált víz helyett háromszor desztillált vizet használva kétsejtes egérembrío blastocystává fejlődése 36%-ról 93%-ra nőtt [205]. A szarvasmarha embriók nyolcsejtes állapotól blastocysta stádiumig jól fejlődnek egy aránylag egyszerű összetételű foszfát pufferben (PBS), akár magzati borjú, akár bárány savóval kiegészítve [209]. Kane a fehérje és szérum kiegészítés hatását vizsgálta az embrió fejlődésére. Az egyébként változatlanul hagyott körülmények között a patkány morulák fejlődését különböző időpontokban gyártott (Sigma) BSA hozzáadása mellett tesztelte [96, 97].

Az egérembrió tenyésztési közeg energiaforrásaival foglalkozó munkák legtöbbször kiemelik a piruvát és laktát fontosságát [19, 203]. Leese és Barton igazolta, hogy az egér granulosa sejtek képesek piruvátot termelni [112].

Kísérletek igazolták, hogy mind a hosszú, mind rövid láncú zsírsavak szolgálhatnak energiaforrásként a közegben, ha BSA-hoz kötöttek. Ez különösen lényeges szarvasmarha embriótenyésztésnél, mert jól ismert, hogy ennél a fajnál az acetát egy nagyon jelentős energiaforrás a vérben [95]. Megállapították, hogy a nyúl blastocysta expanszióhoz 11 fajta B vitamin és növekedési faktor szükséges. Ezek mindegyike megtalálható a Ham's F 10 kultivációs közegben, viszont az ebben a tápoldatban levő B<sub>12</sub> mennyisége túl magas, toxikus a nyúl blastocysta számára. Igazolták, hogy a nyúlembrió blastocysta növekedésénél az inozitol a legfontosabb limitáló tényező. Az optimális inozitol szint  $7,5 \times 10^{-5}$  M, amely lényegesen nagyobb, mint amilyen mennyiségben ez a vegyület a Ham's F10-ben megtalálható [98].

Egér embrió kísérletekben azt tapasztalták, hogy CO<sub>2</sub>/HCO<sub>3</sub> hiányában csak egy vagy két osztódás történik meg, ezután a fejlődés leáll [159]. A nyúlembrió egy sejtestől morula stádiumig képes fejlődni CO<sub>2</sub>/HCO<sub>3</sub> hiányában, de blastocystává nem alakul át [94]. Megállapították, hogy a CO<sub>2</sub> szerepe jelentős lehet a pH szabályozásában. Azt találták, hogy a 10%-os CO<sub>2</sub> gáz fázis alkalmazásakor feltűnően több nyolc sejtes embrió fejlődött blastocystává, mint 5%-os CO<sub>2</sub> alkalmazásánál [22]. Az 5%-ra csökkentett O<sub>2</sub> elősegíti az egy sejtes embrió fejlődését [204]. Igazolták, hogy alacsony O<sub>2</sub> nyomás növeli az osztódási rátát a korai egérembriónál [160].

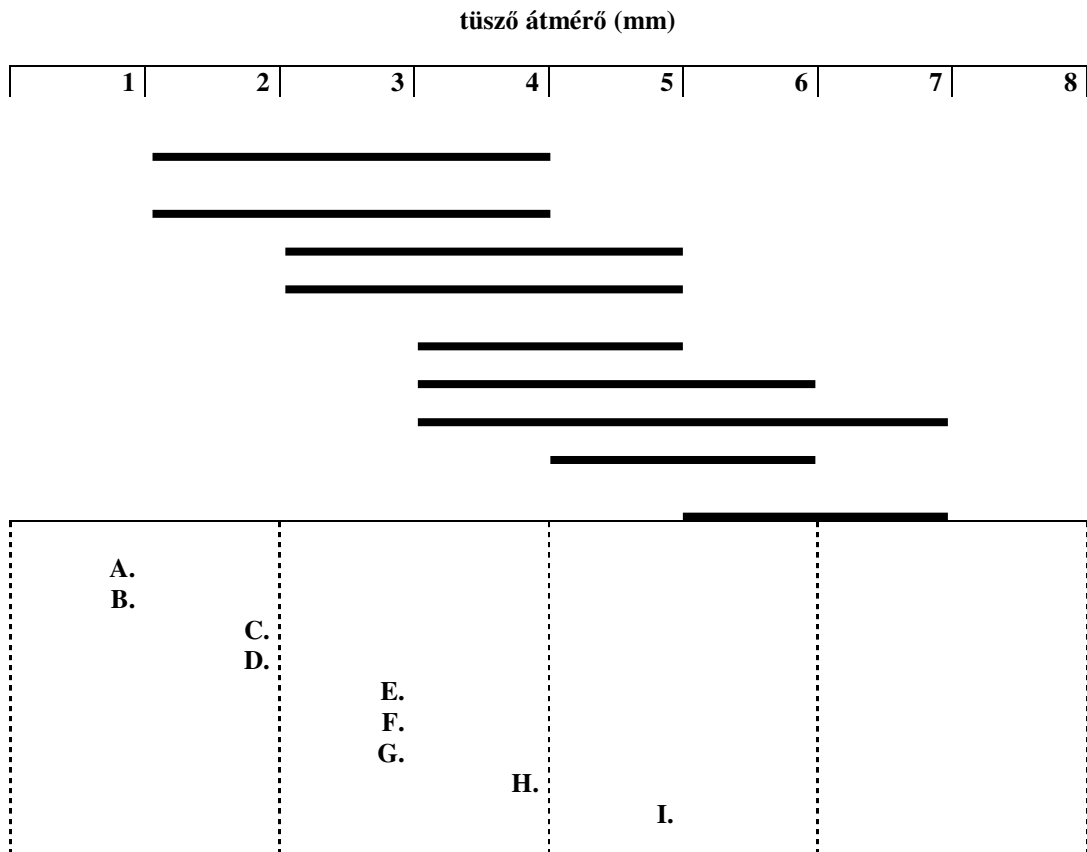
Az eddigiekből is látszik, hogy a tenyésztési közeg sohasem reprodukálhatja a petevezető vagy a méh természetes környezetét, de néhány biokémiai paramétert, mint az O<sub>2</sub> tenziót, vagy az energiaforrásokat az in vivo tanulmányok alapján az optimálisához közelíthetjük.

Ha az embrió egy bizonyos fejlettségi állapotot elér, továbbtenyésztése már aránylag egyszerű feltételek mellett is megoldható. Nagyon sok laboratóriumi eredmény azt igazolta, hogy a különböző állatfajoknál létezik egy „block to development” állapot, mely legyőzésének egyik módja a nyúl petevezetőbe helyezés [16]. A petevezetőben in vivo olyan vegyületek, közöttük növekedési faktorok szabadulnak fel, amelyek szükségesek az információk sejthártyán való átjutásához, ezek a vegyületek nem fajspecifikusak, de nagyon nehéz a tenyésztő közegbe helyezni őket, mert nehezen oldódnak [99]. Számos kutató foglalkozott a szaporodási szervrendszer különböző részeiből nyert sejtek embrióval történő cocultiválásával. Az egysejtes embriókat méh fibroblast sejtekkel együtt tenyésztve néhány osztódást figyeltek meg [166]. Lényegesen jobb eredményt kaptak a petevezető monolayeren (egysejt-rétegen) való embriótenyésztéssel. A petevezető sejteket a kettémetszett petevezető felszínének lekaparásával, vagy az embrió mosáskor leszakadt sejtek összegyűjtésével nyerték. A sejtpreparátumok mind csillós, mind kiválasztó sejteket tartalmaztak. A kialakuló monolayer szerepe valószínű a különböző növekedési faktorok és a közeg detoxifikációjában nyilvánult meg [62]. Kimutatták, hogy a tenyésztett petevezető sejtek által kiválasztott fehérjék és az in vivo kiválasztottak nagyon hasonlóak voltak. Feltételezhető, hogy a petevezető sejtek egy mitogén választanak ki, amely stimulálja az embriófejlődést [63]. Az embriótenyésztés kezdeti nehézségeihez képest az elongálódó blastocysta erőteljes osztódási képességgel rendelkezik. Így a 12-14 napos juh és szarvasmarha embrió feldarabolható és könnyen tovább tenyészthető. Egy nap múlva trophoblast vesiculumok fejlődnek. Scanning elektronmikroszkópos felvételeket készítette ezekről a képletekről, megállapítható, hogy számos microvillus található a felszínükön jelezve, hogy intenzív szekretoros tevékenységet folytatnak [78]. Mindezen kísérletek alapján további vizsgálódásokat folytattak egy-nyolcsejtes juh és szarvasmarha embriók fejlődését azonos fajból származó trophoblast

vesiculumokkal együtt tenyésztve [20]. Megállapították, hogy a trophoblast vesiculumnak nem szükséges közvetlenül érintkeznie a korai fejlődési állapotú embrióval. Valószínű, hogy ezen képletek segítő hatásukat különböző növekedési faktoroknak a közegbe való kiválasztásával érik el. Szétválasztva ezeket a vegyületeket ultrafiltrálást és sephadex gélfiltrálást alkalmazva, azt tapasztalták, hogy az alacsony molekulásúlyú peptidok (Ms: 180-2500) frakciójával együtt embriók sokkal nagyobb arányban (61.9%) jutottak túl a nyolcsejtes állapoton, mint a magas (Ms>10000) molekulásúlyú frakcióval együtt tenyésztettek [79].

## 2. SERTÉS PETESEJTEK IN VITRO MATURÁCIÓJA

A sertés ivari ciklusa alatt a tüszők száma és mérete igen jelentősen változik a 16. és 21. nap között [82]. A szteroid koncentráció és a gonadotropin kötő képesség nő a 20. napig és csökken a 21. napon [182]. Ezzel szemben a granulosa sejtek tüszőnkénti száma nagymértékben növekedik a 20. és 21. nap között [70]. Az in vitro maturáltatásnak az ivarérés előtti kocasüldők vágóhídi petefészkéből származó COC (cumulus oocyta complex: egyenletes citoplazmájú petesejt kompakt cumulus réteggel körülvéve) a legáltalánosabban használt forrása. Különböző kutatócsoportok eltérő méretű secunder (antralis) folliculust tartanak megfelelőnek az in vitro maturáltatásra. A 8. ábráról leolvasható mérethatárok 1-8 mm között változnak, a legtöbb kutató a 2-6 mm közötti folliculust tekinti megfelelőnek. Bizonyítást nyert, hogy a tüszők szteroid kiválasztó és petesejt érlelő képessége sokkal inkább függ a tüsző korától, mint méretétől. A petesejt minőségét befolyásolhatja a kinyerés módja, mely kétféle lehet: a tüszők szikével való felvágása, vagy injekciós tűvel történő aspiráció [138].



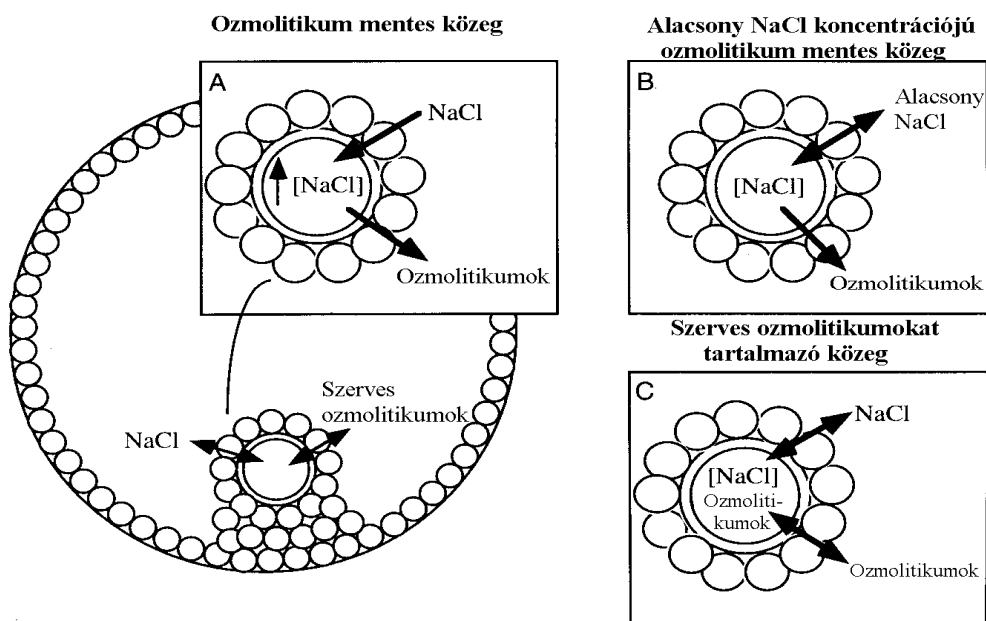
8. ábra. A különböző kutatócsoportok által a cumulus-oocyta complex kinyerésére megfelelő méretűnek tekintett tüszők.

A [106] B. [218] C. [28, 111, 140, 165, 180, 198, 216] D. [35] E. [104, 117, 137, 142, 176] F. [54, 59, 121, 138] G. [37] H. [123, 178, 210].

A sikeres petesejt maturáció alapvető feltétele, hogy megértsük a fiziológiai mechanizmust, mely felfüggeszti a petesejt meiózisos osztódását, majd az ovuláció közeledtével újraindítja azt. Megállapították, hogy a sertés petesejt germinális vesiculum állapotban marad a hCG injektálást követő 18. óráig és a meiózis metafázis II állapotát 35-37. órára éri el [86]. Korszerű ultrahangos technikával az ovuláció átlagát  $44 \pm 3$  órára becsülték az LH csúcsot követően [164].

A luteinizáló hormon stimulációjára a tüszősejtek felfüggesztik a meiózist gátló faktorok termelését (pl. TGF  $\beta$ ) [26] és megkezdik, illetve folytatják a stimuláló növekedési faktorok termelését a tüszőfolyadékba, ahol azok felhalmozódnak és biológiailag aktív szintet érnek el. Sokféle növekedési faktort izoláltak a folliculáris folyadékból: IGF, EGF, NGF és TGF, valamint ezen faktorok mRNS-ét is detektálták a különböző folliculus sejtekben. Ezek a növekedési faktorok aktívan befolyásolják a szomatikus sejtek növekedését, differenciálódását és szteroidgenezisét. Az IGF-I elősegíti a meiózis előrehaladását metafázis II. állapotig [116], míg az EGF a cumulus sejtek expanzióját befolyásolja [36, 52]. Újabb kutatási eredmények szerint az NGF szerepel esetleg secunder messengerként a meiózis beindításában [64]. A növekedési faktorokon kívül még számos eddig ismeretlen faktor halmozódik fel a folliculus folyadékban és vesz részt az oocyta érésében [121].

A petesejtek citoplazmatikus érését befolyásoló legfontosabb tényező a petesejt belső glutation szintje, mely számos más hatása mellett befolyásolja a spermium penetrációt követő sperma protamin diszulfid hidak redukcióját és kicserélődését a petesejt által termelt hisztonokra [148]. A kultivációs közeg komponensei közül a nátrium-klorid koncentráció változása van a legjelentősebb hatással a citoplazmatikus maturációra. A magas NaCl-tartalom csökkenti a petesejt glutation szintjét, károsan befolyásolja a mikrofilamentumok rendszerét [32]. A tüszőfolyadék viszonylag magas NaCl koncentrációjú, de a  $\text{Na}^+$  sejtbe jutását és ott az ionerősség mértékének a sejtbe nézve káros emelkedését az állati szervezet a tüszőfolyadékba szerves ozmolitikumok kiválasztásával (szorbit, taurin) csökkenti (9. ábra), ebben az esetben a közegben létrejövő ozmotikus egyensúly hatására a  $\text{Na}^+$ -ionok sejtmembránon keresztüli passzív transzportja lassul [56].



9. ábra. A petesejt viselkedése különböző NaCl-koncentrációjú és ozmolitikum mentes, továbbá ozmolitikumot tartalmazó közegben

A kultivációs közeg fehérje és hormon kiegészítésének hatása a maturációra: Fehérje kiegészítésként fetalis borjú savó (FCS) [139], vagy újszülött malac szérum (NPS) [136], vagy szarvasmarha szérum albumin (BSA) [135] kiegészítés lehetséges. Azonban, amikor a mKRB oldathoz FSH kiegészítés mellett FCS hozzáadás történt a sertés petesejtek érése csak kis számban tette lehetővé hím pronucleusok kialakulását [140]. Valószínű, hogy az FCS vagy NPS jelenlétében a petesejt maturációs folyamatok nagyon felgyorsulnak, és ez akadályozza a hím pronucleusok kialakulását [54, 218]. A protein mentes maturációs közeg ösztadiol kiegészítése megfelelő cumulus expanziót biztosít [161].



A maturációs közeg sertés tüszőfolyadékkal és FSH-val való kiegészítése elősegíti az éretlen petesejtek maturációját, hogy sikeresen eljussanak a metafázis II állapotba [140]. Ugyancsak kedvezőnek bizonyult a petesejt érlelés szempontjából a tápközegbe kifordított folliculus helyezése [120], illetve a folliculus sejtek mellé kiegészítésként LH adagolása [122].

A sertés petesejtek maturációját elősegíti, ha a 20 óra PMSG, hCG kezelést 20 óra hormonmentes érlelés követ [57]. Megállapították, hogy a COC-k 12h inkubálása a maturációs mediumban a hormon-kiegészítés előtt növeli az IVM/IVF utáni embriófejlődés esélyeit [55].

A fertilizációt követő hím pronucleus kialakulásának valószínűsége pozitív korrelációban van a petesejt glutation szintjével a maturáció végén [216]. A hím pronucleus kialakulásához hozzásegít a cisztein hozzáadása [58, 72, 215], mivel a petesejt glutation szintje nő a maturáció alatt, ha ciszteint juttatunk az érlelő közegbe és csökken cisztein adagolás nélkül [217].

### **3. SERTÉS PETESEJTEK IN VITRO FERTILIZÁCIÓJA**

A legtöbb in vitro fertilizációs rendszerben relatíve nagy számú ondósejtet juttatnak az érett petesejteket tartalmazó IVF közegbe [139].

Több szerző javasolta alacsonyabb spermium koncentráció IVF közegbe juttatását, hogy kevesebb spermium érje el a petesejt felszínét [9, 55].

In vivo kísérletekben polispermiát figyeltek meg, amikor túl nagy mennyiségű élő spermiumot helyeztek a petevezetőbe [88, 89]. Ezért kísérleteket folytattak melynek célja az volt, hogy megállapítsák a kapacitált spermiumok optimális számát a petesejt közelében a fertilizáció időpontjában [29, 163, 211].

Megállapították, hogy a különböző sertés kanok spermiumainak a petesejt membránján való áthatoló képességében igen nagy különbségek észlelhetők [117, 199]

Bár mind a Tris-puffer közeg [1], mind a bikarbonát-puffer közeg [188] alkalmas in vitro körülmények között a spermiumok penetrációjának biztosítására, de a legtöbb kutatócsoport friss spermát használva a fertilizációra a bikarbonát-puffer rendszert használja. Megállapították, hogy a bikarbonát a sperma felszíni fehérje struktúrában változásokat okoz [7] és komoly változásokat okoz a membrán lipid szerkezetében is [75] amely erősen befolyásolhatja a kapacitációs folyamatokat.

Úgy tűnik: a bikarbonátnak kulcsszerepe van a sperma membrán destabilizálásában [76, 193]. Ez a megfigyelés harmonizál azzal, hogy a bikarbonát szint alacsony a mellékhere farki részében, az ejakuláció alatt nagy mértékben nő, és magas szinten marad a női nemi utakban is [170].

Egy tradicionális IVF rendszerben, ahol módosított Medium199 közeget használnak fagyasztott-visszaolvasztott spermiumoknál lassan játszódik le a kapacitációs folyamat, ennek eredményeként az acrosoma reakción átesett spermiumok száma nagyon lassan emelkedik a petesejtekkel történő cocultiválás során a módosított tris-puffer közegben megvalósított IVF-hez képest [60].

Hasonló eredményeket kaptak mélyhűtött-visszaolvasztott spermiumok helyett friss spermiumokkal történő IVF esetében is [124].

#### **4. IN VITRO EMBRIÓFEJLŐDÉS**

A sertésembriók in vitro tenyésztésekor a fejlődési blokk négysejtes morula állapotban következik be, amikor az anyai genom által vezérelt irányítást a fehérjeszintézisben az embrionális genom veszi át [33, 61]. Az in vivo maturáltatott és termékenyített embriók tenyésztéséhez aránylag egyszerű kémiai összetételű

médiumot használnak. Egysejtes zigóták blastocysta állapotú embrióvá fejlődését sikerült elérni Whitten's médiumban 5% O<sub>2</sub>, 5%CO<sub>2</sub> és 90%N<sub>2</sub> gázkeverékben [13, 138], illetve ugyanezen médiumban szén-dioxid-termosztátban [129, 154], valamint NCSU médiumban [150]. A Whitten's médium és az NCSU-médiumok összetétele hasonló. A két tápközeg összetételében a különbség annyi, hogy az utóbbi közeg szerves ozmolitikumokat tartalmaz és a NA<sup>+</sup> koncentráció alacsonyabb, mint a Whitten's médiumban. Mivel összetételében jobban hasonlít a sertés petevezetőben in vivo körülmények között fennálló viszonyokhoz újabban többen foglalkoznak ennek alkalmazásával [149].

Petesejtek in vitro maturációját in vivo fertilizáció követte 1974-ben, ez volt az első próbálkozás sertés petesejtek érlelésére [134]. Fontos lépés volt az első sikeres in vitro maturációt követően in vitro fertilizáció, amely ligált sertés petevezetőben érlelt spermiumokkal történt [91].

In vivo maturáltatott embriók in vitro termékenyítése friss spermával először 1986-ban eredményezett élő malacokat [25]. In vitro érlelés és in vitro termékenyítést követően először Mattioli munkacsoportjának sikerült malacokat előállítania [121].

A módszer hatékonyságának javítását a kapacitációs körülmények megváltoztatásával [163], a spermakonzentráció csökkentésével [164], valamint a spermiumok oviductus folyadékkal való cocultiválásával [138] sikerült elérni. Az in vitro maturáltatott, in vitro fertilizált embriók blastocystává fejlődésének, ill. recipiens állatba ültetés utáni megszületésének hatékonysága elsősorban az in vitro maturációs feltételektől függ. Az in vitro maturáltatás a jól definiálható egyszerű szintetikus kultivációs rendszerek felé halad [43] a gazdasági állatok túlnyomó többségénél. Úgy tűnt a sertésnél az éretlen petesejt-complex mag- és citoplazmatikus érése csak tüsző somaticus sejtekkel és/vagy folliculus folyadék kiegészítés mellett valósítható meg [2, 33, 122,]. Abeydeera különböző tápközegekben vizsgálta az egyik növekedési faktornak az EGF-nek petesejt érlelésre

és a fertilizáció utáni embriófejlődésre gyakorolt hatását és kiváló eredményeket sikerült elérnie [4].

A növekedési faktorok in vitro maturációban betöltött szerepe még részben tisztázatlan és nagyon ígéretes kutatási terület: EGF[165], IGF [165, 210].

Eddig egyetlen kutatócsoportnak sikerült mélyhűtött spermával történő termékenyítés és az embrió recipiens állatba ültetése után élő malacot produkálnia [1].

## **V. A SERTÉS EMBRIÓ IN VITRO TENYÉSZTÉS JELENTŐSÉGE**

Transzgenikus állatokat, a többi haszonállathoz hasonlóan, sertésből is sikerült előállítani. Pursel [158] csoportjának sikerült növekedési hormon bejuttatása mikroinjektálással, más kutatócsoportoknak különböző emberi gyógyászatban hasznosítható fehérjéket sikerült termeltetnie a transzgenikus sertést bioreaktorként használva [133, 172].

Az összehasonlító géntérképezési eredmények alapján ismertté vált, hogy a sertés génkészlete mintegy 80%-os egyezést mutat az emberével [197].

Várhatóan növekedni fog a sertés emberi betegségek modellállataként való felhasználásának jelentősége[190].

Intenzív kutatások folynak a xenotranszplatáció /idegen fajból pl. sertésből származó szervek emberbe juttatása / területén. Régóta ismert, hogy a filogenetikai távolság ellenére a sertés anatómiai és fiziológiai felépítésében hasonló az emberhez és ezért jöhet szóba szervdonorként [207].

A szervtranszplantáció (szív, máj, vese) mellett jelentős szerep juthat a sejt illetve szövettranszplantációnak, így pótolhatók lennének a beteg vagy hiányos szövetek,

mivel kellő mennyiségű emberi sejt nem áll rendelkezésre. A legmegfelelőbb forrást a primer sejtek szolgáltatják. Néhány próbálkozás történt már történt kapszulázott sertés pankreas sejtek diabetes, és sertés foetalis neuronok Parkinson kór gyógyítására való felhasználására [41]. A világon eddig végrehajtott szervátültetéseket az 1. táblázat tartalmazza [110].

1. táblázat. A világban eddig ismert kísérletek szerv/ szövet transzplantációra

Sebész/ műtét éve	Donor fajtája	Transzplantált szerv	db	A beteg élete a műtét után (napok)
Priceteau/ 1905	nyúl	vese szövet	1	16
Jaboulay/ 1906	sertés kecske	vese vese	1 1	3 3
Neuhof/ 1923	juh	vese	1	9
Cooley/ 1968	juh	szív	1	<1
Ross/ 1968	sertés	szív	2 <sup>b</sup>	<1
Religa/ 1992	sertés	szív	1	1
Makowka/ 1993	sertés	máj	1	<2

*b Egy szívet emberi vérrel feltöltöttek, de nem használták fel*

A xenotranszplantáció gátja az azonnali kilökődés, mely több módszerrel külön külön vagy azok kombinálásával legyőzhető. Ennek módja pl. olyan sertések

előállítás, melyek humán complement aktivitást késleltető faktort termelnek [186]. Ilyen sertésszervek páviánba ültetve (2. táblázat) 2-35 napig életképesek maradtak [110]. A xenotranszplantáció alkalmazását kérdésessé teheti, ha bebizonyosodik, hogy a sertések különböző populációiban emberi-trópusi provírusok vannak. Két emberi retrovírus osztályról ezt már bebizonyították [183].

Kidolgozhatók olyan érzékeny módszerek, amelyekkel az eddig ismert humán retrovírusok felismerhetők, valamint a beültetendő sertés szövet vagy szerv reverz transzkriptáz aktivitásának ellenőrzése PCR-rel megtörténhet.

2. táblázat. Transzgénikus sertés szerv xenotranszplatációs eredmények

<b>Kutató/ év</b>	<b>Sertés szerv</b>	<b>n</b>	<b>Túlélés</b>
Mc Curry/ 1995	szív	3	4, 11, 30 óra
Kroshus/ 1997	szív	4	<10 nap
Wateworth/ 1997	szív	3	2, 13, 21 nap
Lin/ 1997	szív	6	<29 nap
Norin/ 1996	tüdő	?	<12 óra
Yeatman/ 1997	tüdő	4	<3óra
<b>Dagett/ 1997</b>	tüdő	3	12 óra (átlag)
Zaidi/ 1997	vese	7	<35 nap átlag: 13 nap
Diamond/ 1997	vese	7	<15 nap

# ANYAG ÉS MÓDSZER

## 1. A VIZSGÁLATOK HELYSZÍNE ÉS IDEJE

A kísérleteket 1998 január és 1999 novembere között a Pannon Agrártudományi Egyetem Mosonmagyaróvári Mezőgazdaságtudományi Kara Állattenyésztési Intézetének laboratóriumában, illetve 1999. április 19. és május 14. között az Amerikai Egyesült Államokban az University of Missouri Columbia Department of Animal Sciences-ben, B.N. Day laboratóriumában Lalantha Abeydeera segítségével végeztem.

## 2. A LABORATÓRIUM MŰSZEREZETTSÉGE

### 2. 1. Széndioxid termosztát

A Forma Scientific cég által forgalmazott 120 l belső űrtartalmú inkubátor. A hőmérséklet beállítása a sertés petesejtek kultiválásához optimális: 38,5 °C-ra történt. Az inkubáláshoz 5% CO<sub>2</sub> tartalom szükséges, a kívánt hőmérsékleti és CO<sub>2</sub> koncentráció értékek beállíthatók, és a készülék automata riasztóval rendelkezik, mely hanghatással jelzi a beállított értékektől való esetleges eltérést.

### 2. 2. Mikroszkóp

IMT2 inverz mikroszkóp fluoreszcens és normál megvilágítással fáziskontraszt és Nomarski interferencia feltétellel. A mikroszkóp 10x okulárok mellett 4x, 10x, 20x, 40x planachromat objektív lencsék tartoznak. A fényképezéshez egy digitális kamera csatlakozik a mikroszkóphoz, mely egy DP10-es színes nyomtatóval van ellátva, illetve a képek közvetlenül a számítógép memóriájában tárolhatók.

### **3. A KÍSÉRLETEKHEZ ALKALMAZOTT TÁPTALAJOK**

#### **3.1. A maturáltatáshoz alkalmazott táptalajok**

A petesejtek in vitro érleléséhez használt táptalajok: NCSU 23 (alkotórészeiből összeállítva), TCM 199 (Sigma M 5017), Waymouth (Gibco MB752/1 51400-018) összetevőinek táblázatos összefoglalását a 2. táblázat tartalmazza. Mivel jelentős különbség adódott a vizsgált táptalajok között az aminosav összetétel tekintetében, ezért az NCSU 23 táptalaj 1% esszenciális aminosav (Sigma M 7020), illetve a TCM 199 és NCSU 23 0,1 mg/ml cisztein (Sigma C 8152) kiegészítését tartottam szükségesnek. Minden vizsgált táptalajnál a 10% folliculus folyadék kiegészítés hatását is elemeztem.

#### **3.2. Az in vitro fertilizációhoz alkalmazott táptalajok összetétele**

A kísérletek többségénél a mTBM (módosított Tris Buffer Medium) közeget alkalmaztam, mely a következő komponensekből állt: 113,1 mM NaCl (Sigma S 5886); 3 mM KCl (Sigma P 5405); 7,5 mM CaCl<sub>2</sub> x2H<sub>2</sub>O (Sigma C 7902); 20 mM Tris (Sigma T 1410), 11 mM glükóz (Sigma G 6152), 5 mM nátrium-piruvát (Sigma P 2256), 0,1% BSA (Sigma A 8022) és 1mM koffein (Sigma C 0750).

TCM 199 közeg 1 mM koffein (Sigma C 0750) és 7 mM kalcium-laktát (Sigma L 4388) kiegészítéssel.

#### **3.3. Az embriótenyésztés közege**

A megtermékenyült zigóták tenyésztése a maturáltatásnál ismertetett NCSU 23 tápközegben történt, amely 0,4% BSA (Sigma A 8022) kiegészítést tartalmazott.



2. táblázat. A maturáltatáshoz használt táptalajok kémiai összetétele

VEGYÜLET	TÁPTALAJ ÉS ÖSSZETEVŐK KONCENTRÁCIÓJA (mM)		
	Módosított <b>TCM 199</b>	Waymouth médium	<b>NCSU23</b> médium
NaCl (Sigma S 5886)	111,36	102,65	108,73
KCl (Sigma P 5405)	5,37	2,01	4,78
CaCl <sub>2</sub> (Sigma C 7902)	1,80	0,81	1,70
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (Sigma P 5655)	–	0,59	1,19
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,01	–	–
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	–	2,11	–
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O (S. M 7774)	0,81	–	1,19
MgCl <sub>2</sub>	–	1,18	–
NaHCO <sub>3</sub>	26,19	26,67	25,07
glukóz	8,61	27,75	5,55
Na-piruvat	0,91	–	–
Ca-laktát	–	1,71	–
cisztein	0,00083	0,83	–
glutation	0,00016	0,05	–
glutamin (Sigma G 9003)	0,68	2,40	1,00
taurin (Sigma T 7146)	–	–	7,00
hipotaurin (Sigma H 1384)	–	–	5,00
Összes Na <sup>+</sup>	144,47	133,54	133,80

#### 4. A PETESEJTEK MATURÁLTATÁSA

##### 4. 1. A petesejtek nyérése, maturációs körülmények

A sertés petefészkek, melyek nagy fehér hússertés fajtacsoportba tartozó egyedektől származtak, a helyi vágóhídról termoszban 25 °C-n szállítva kerültek a laboratóriumba 0,9% NaCl-ban, amely 75 µg/ml penicillin G (Sigma PEN-K) és 50 µg/ml sztreptomycin szulfátot (Sigma S 6501) tartalmazott. A petefészkek átválogatása és a sárgatestet vagy cystát tartalmazók szelektálása után, csak a vélhetően prepuberális állatokból származó petefészkek kerültek felhasználásra. A petefészkek felületén levő szennyezések eltávolítása kétszer 200 ml antibiotikum tartalmú friss fiziológiás sóoldatba helyezéssel, majd kétszeri TL-Hepes-polivinil alkoholos mosással történt. A petesejteket, tüszőfal-sejtdarabokat és a tüszőfolyadékot a petefészkek 2-6 mm átmérőjű tüszőinek 10 ml-es műanyagfecskendőre csatlakoztatott 18 G jelű injekciós tűvel történő leszívásával nyertem. A kinyert folyadékot hagytam leülepedni egy 10 ml-es kónuszos kémcsőben: a szupernatanst leöntöttem, ez tartalmazta a tüszőfolyadékot (ennek kezelését később tárgyalom). Az üledéket TL-Hepes-polivinil alkoholban történő reszusz-pendálás után ismét hagytam leülepedni. A folyamat kétszeri ismétlése, majd az üledék inverz mikroszkóp alatti átvizsgálása következett. Kiválogattam azokat a petesejteket, amelyek compact cumulus réteggel voltak körülvéve és a citoplazma egyenletes denzitású volt, valamint kokultiváláshoz 600-700 µm hosszúságú tüszőfal-sejtdarabokat, és háromszor átmostam hormon kiegészítést tartalmazó in vitro maturációs közeggel. Azután 30-40 petesejtet helyeztem 400µl maturációs médiumba, melyhez 10 NE PMSG (Werfaser - WERFFT-CHEMIE GesmbH) és 10 NE HCG (Werfacher - WERFFT-CHEMIE GesmbH) kiegészítés szükséges. Tüszőfal-sejtdarabokkal történő kokultiváláskor a 30-40 petesejt mellé hat 6-700 µm

hosszúságú szomatikus sejt preparátumot helyeztem. Három 400 µl maturációs médium cseppet helyeztem el egy 5 cm átmérőjű műanyag Petri csészében (Spectrum 3D), melyet ásványi olajjal (Sigma M 8410) lefedtem és előzetesen CO<sub>2</sub> inkubátorban equilibráltattam. 44 órás maturáltatás következett.

#### 4. 2 A petesejtérés ellenőrzése cumulus sejtek expansziójának becslése alapján

Inverz mikroszkóp alatti szubjektív bírálat alapján három kategóriát állítottam fel: 1 kategória: nincs expanszió; 2 kategória: csekély expanszió, csak a cumulus sejtek legkülső egy-két rétege lazult fel; 3 kategória: a cumulus sejtek expansziója a corona radiata sejtek kivételével.

#### 4. 3. A tüszőfolyadék nyerése és tárolása

A petesejt nyerésnél ismertetett módon a 2-6 mm átmérőjű petefészek tüszők leszívása. Az ülepítés után a felülúszó centrifugálása 1500 g, 30 perc, 4°C-n az alakos elemek eltávolítása érdekében. A felülúszó baktérium mentesítése 1,2 µm 10 ml-s fecskendőre csatlakoztatható szűrőn és -20°C-n tárolás felhasználásig.

#### 4. 4. A sejtosztódás fázisának megállapítása

A petesejteket a sejtmagérés fázisának megállapításához a vizsgálat időpontjában a cumulus sejtektől való mentesítés érdekében 0,1% hyaluronidase (Sigma H 3757) enzimmel kezeltem, ezután tárgylemezen rögzítés következett, majd fixálás ecetsav: etanol 1:3 arányú keverékében 48-72 óráig egy lezárható 5x10 cm műanyag dobozban szobahőmérsékleten. A következő fázis a tárgylemezen fixált petesejtek 45%-os ecetsavban oldott 1%-os orceinnel (Sigma O 7505) történő festése volt. Az

inverz mikroszkóp 200x és 400x nagyítása mellett megvizsgáltam, hogy a petesejtérés meddig haladt előre. Osztályozás [73, 106] alapján: GV (Germinalis vesiculum) Met I. (metafázis I.) Met II. (metafázis II.).

## 5. A PETESEJTEK IN VITRO FERTILIZÁCIÓJA

### 5. 1. A mélyhűtött kansperma előkészítése termékenyítéshez

A műszalmában mélyhűtött termékenyítő anyag visszaolvasztása 37 °C vízfürdőben 40 másodperc alatt történt, majd háromszor 1900 g 4 perc centrifugálással Dulbecco PBS-ben (Sigma D 5773) - amely 0,1% BSA kiegészítés mellett 75 µg/ml penicillin és 50 µg/ml gentamicin szulfátot (Sigma G 1264) tartalmazott (pH 7,2) - történő átmosás következett. A mosási procedúra végén a spermium pellet 100 µl in vitro fertilizációs médiumban került újraszuszpendálásra.

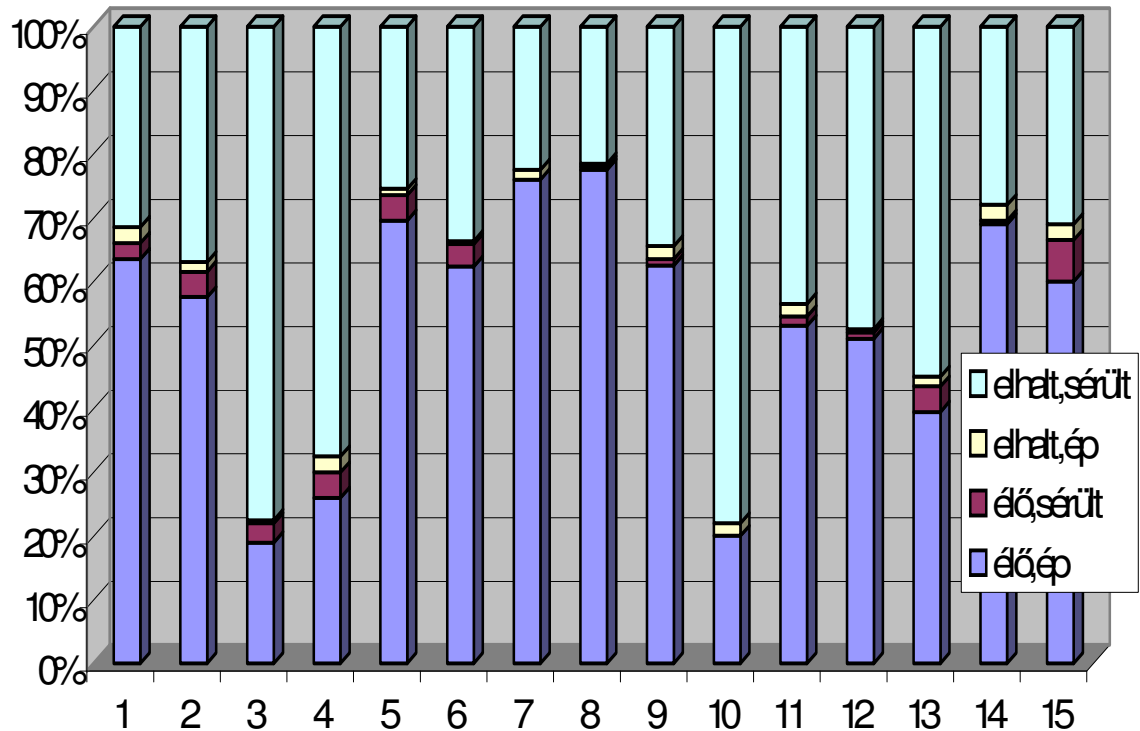
### 5. 2. A kansperma életképességének vizsgálata

A kísérletekhez 15 magyar nagy fehér hússertés kan termékenyítő anyagát tartalmazó négyszáz 0,25 ml-es műszalma volt felhasználható, amelyet az Országos Mesterséges Termékenyítő RT. Debreceni Állomása bocsátott az Intézet rendelkezésére. A kansperma életképességének vizsgálatához a motilitási bírálatot elvégezve, a vizsgált minták mindegyikének motilitási értéke 35-40% volt. A spermiumok életképességének bírálatához ezután a Kovács-Foote [88] spermafestési eljárás került alkalmazásra. Az eredmények a 9. ábrán láthatók.

A festési eljárás:

1. A tárgylemezre tripánkék és hígított visszaolvasztott sperma csepp (azonos térfogatú) készítése, összekeverés, kenet készítés, szárítás.
2. A tárgylemezek 2 percre rögzítő oldatba helyezése, ezután csapvízzel öblítés.
3. A lemezek festése Giemsa-ban 16-24 óráig, ezután szárítás, értékelés.

Az élő/elhalt sejtek kimutatására 0,25% tripánkék (Sigma T 6164) szolgál 0,81 NaCl-ben oldva. A rögzítő oldat 86 ml 1n HCl és 14 ml 37% formaldehid elegyében oldott 0,2% neutrálvörös (Sigma N 2880). Az acrosoma festék 7,5% Giemsa törzsoldat (Sigma GS 500) desztillált vízben.



9. ábra. Mélyhűtött/ visszaolvasztott spermiumok élő/elhalt festése

*elhalt, sérült:* elhalt spermium, acrosoma sérült/nincs

*elhalt, ép:* elhalt spermium, ép acrosoma

*élő, sérült:* élő spermium, acrosoma sérült/nincs

*élő, ép:* élő spermium, ép acrosoma

Az eredmények alapján a 8. sz. kant választottam ki, és ezt a termékenyítő anyagot használtam az in vitro fertilizációs kísérletek túlnyomó többségénél, kivételt képezett a különböző kanok fertilizációs képességének összehasonlító vizsgálatát célzó kísérletek, valamint az USA-ban végzett vizsgálatok.

### **5. 3. Az in vitro fertilizáció körülményei**

A petesejt maturáltatás végeztével a cumulus sejtek eltávolítása érdekében 0,1% hyaluronidase enzimkezelés alkalmazása volt szükséges. Ezután háromszori átmosás következett módosított mTBM oldattal, amely 1 mM koffeint és 0,1% BSA-t tartalmazott. A mosást követően 30 denudált petesejt egy 2 cm átmérőjű Petri csésze előre elkészített ásványi olajjal fedett és CO<sub>2</sub> termosztátban equilibráltatott 50 µl fertilizációs médium tartalmú cseppjébe helyezése következett. Az in vitro fertilizációs közeg equilibráltatása feltétlenül fontos, mert a mTBM oldat 9,8-10 pH-jú, így 18-24 órás előinkubálása szükséges CO<sub>2</sub> inkubátorban, hogy a megfelelő pH (7,2-7,3) kialakuljon az oldat felhasználása előtt. A petesejteket tartalmazó Petri csészéket további kb. 30 percre visszahelyeztem a CO<sub>2</sub> termosztátba, amíg a spermiumok fertilizációra történő előkészítése történt. A Dulbecco PBS mosást követően a spermium üledéket újraoldottam in vitro fertilizációs médiumban és a spermium koncentrációt úgy állítottam be Bürker kamrás spermiumszám meghatározás után, hogy figyelembe vettem, a végső fertilizációs térfogat 100 µl. Ezután automata pipettával 50 µl higított kanspermát helyeztem a 30 petesejtet tartalmazó 50 µl fertilizációs közeghez. A petesejtek és ondósejtek 5-6 órás 38,5 °C-n CO<sub>2</sub> inkubátorban történő koinkubálása következett. A TCM 199 táptalajban történő in vitro fertilizációkor a végtérfogat 2ml volt, a spermium koncentrációt úgy kellett beállítani, hogy a végső koncentráció megfelelő legyen.

#### 5. 4. Petevezető egyrétegű sejtenyészet készítése

A petefészek szállításnál és kezelésnél leírtaknak megfelelően, a szennyeződéseket eltávolító mosási eljárásokat követően, a petevezetők megtisztítása szükséges a hozzákapcsolódó szövetektől csipesz és olló segítségével, majd a petevezető egyik végének csipesszel történő lezárása, és tripszin EDTA (Sigma T3924) oldattal történő feltöltése következett. Ezt a petevezető másik végének lezárása után Petri csészében 45 percig TCM 199 oldat alatti tárolása követte. Majd a petevezető kiemelése és átmosása 5 ml tripszin EDTA oldattal, a sejtek összegyűjtése egy Petri csészében, a sejtek disszociálásának gyorsítására pipettázással történt. A tripszin közömbösítését fetális borjúsavóval (Sigma F 4135) végeztem. Ezután a sejteket összegyűjtöttem egy 10 ml-es centrifugacsőben. 1500 g 30 perces centrifugálás után a pelletet 10% fetális borjúsavóval kiegészített TCM 199-ben diszpergáltam. A sejtszám beállítás (110 sejt/ml) után 2 cm átmérőjű Petri csészében tenyésztés következett, 38,5 °C-on, CO<sub>2</sub> termosztátban, 2 ml ösztérfogatban. A tenyésztő közeg cseréje két naponként volt szükséges. A beoltás után 7-9 nap múlva alakult ki az egyenletes oviduct monolayer, azaz egyrétegű sejtenyészet.

#### 5. 5 A zigóták ellenőrzése

Ha a kísérlet célja nem embriótenyésztés volt, akkor is az in vitro fertilizáció kezdete után hat órával a petesejtek spermium mentes közegbe helyezése megtörtént. Tizenkét órával a termékenyítés után a petesejtek, illetve zigóták tárgylemezre rögzítése és állapotuk fixálása következett 48-72 óráig, 1:3 arányú friss ecetsav:etanolban, egy 5x10 cm lezárható műanyag dobozban, szobahőmérsékleten. A zigóták festése a petesejtekhez hasonlóan 1% orceinnel történt, mely 45% ecetsavban volt oldva. A zigóták vizsgálatát inverz mikroszkóppal 200x és 400x

nagyításon végeztem. A petesejtek akkor tekinthetők penetrálódottaknak, ha egy vagy több fellazult spermium fej és/vagy hím pronucleus volt látható a citoplazmában, a hozzátartozó spermium farokkal.

## **6. IN VITRO EMBRIÓTENYÉSZTÉS**

A sperma–petesejt koinkubálás után a zigóták háromszori átmosása következett in vitro embriótenyésztő médiummal, 30 zigóta került 400 µl tenyésztő közegbe, amely 0,4% BSA tartalmazott. A cseppeket 4 cm átmérőjű Petri csészében előzetesen elkészítettem, ásványi olajjal való lefedés után equilibrálás következett CO<sub>2</sub> termosztátban, 38,5°C-n. Az in vitro fertilizáció után 48-144 óra múltán vizsgáltam az osztódó morulává, illetve blastocystává alakuló zigóták arányát inverz mikroszkóp 100 és 200x nagyításánál. Esetenként a blastocysták sejtszámának meghatározásához az előbbieken ismertetett módon orceines festést alkalmaztam.

## **7. STATISZTIKAI ÉRTÉKELÉS**

A kísérleteket 3 párhuzamos ismétlésben végeztem el. A kapott eredményeket kezelésként átlagoltam és szórásukat az Excel program segítségével kiszámítottam. A továbbiakban  $\bar{x} \pm \sigma$  formában jelenítettem meg a táblázatokban és a szöveges értékelésben. A kapott eredmények egytényezős varianciaanalízisét (F próba  $P < 0,05$  valószínűségi szinten) a Statistica program ANOVA/NANOVA részének segítségével végeztem el. Amennyiben a megfelelő eltérésnégyzetek összegekből számított szórásnégyzetek nagyobbak az F kritikus értéknél ( $P < 0,05$ ) a kezelések között szignifikáns különbség van, ellenkező esetben megegyeznek egymással. A kísérleti eredmények értékelésénél felső index értékekkel jelöltem a szignifikánsan



eltérő értékeket. (A Statistica programban szerkesztett diagramokon a szórás ábrázolása is megvalósítható.)

## EREDMÉNYEK

### 1. A meiózis újraindulása különböző in vitro maturációs közegekben

Célunk egy megfelelően működő in vitro maturációs fertilizációs embrió tenyésztési rendszer kialakítása volt. Ennek érdekében első kísérletsorozatunkban arra kerestünk választ, hogy az irodalomból ismert különböző tápközegek közül melyik milyen eredményességgel alkalmazható a petesejtek megfelelő in vitro maturáltatására. A kísérleteket három in vitro érlelésre alkalmazott táptalaj összehasonlításával végeztük. NCSU 23 [1, 3, 150]; TCM 199 [4, 29, 215]; Waymouth [3, 29, 215] tápközeg mindegyik táptalajhoz az anyag és módszer fejezetben ismertetett módon elkészített 10% folliculus folyadék kiegészítést alkalmaztunk. Mivel a Waymouth és TCM 199 táptalaj aminosavakat tartalmaz az NCSU 23 táptalajt kiegészítettük 1% esszenciális aminosavval. Figyelembe vettük, hogy a közeg cystein tartalma nagyon fontos a glutation kialakulása szempontjából [58, 216] és ezért a TCM 199 és NCSU 23 táptalajokat 0,1 mg/ml koncentrációjú ciszteinnel egészítettük ki, amely koncentráció a Waymouth táptalajt jellemzi.

Az érlelés után a cumulus expanzió mértéke szerint három kategóriát állítottunk fel, és megállapítottuk a petesejtek meiózisos osztódási állapotát. A kísérleteket három ismétlésben végeztük el. Ha 10% folliculus folyadék (FF) kiegészítést nem alkalmaztunk a cumulus expanzió teljes volt a TCM 199 és Waymouth táptalaj használatakor, azaz a corona radiata sejtek kivételével valamennyi cumulus réteg expandálódott (3. kategória), és nagyon csekély mértékű az NCSU 23 táptalaj alkalmazásakor. Ez utóbbi táptalajban érlelve a petesejteket körülvevő cumulus sejteknek csak a legkülső rétege lazult fel (1. kategória). Ez jelezte, hogy a cumulus sejtek megfelelő fejlődéséhez jobban megfelel a Waymouth és TCM 199 táptalaj.

Folliculus folyadék kiegészítés alkalmazásakor mindhárom táptalaj esetében teljes volt a cumulus sejtek expanziója.

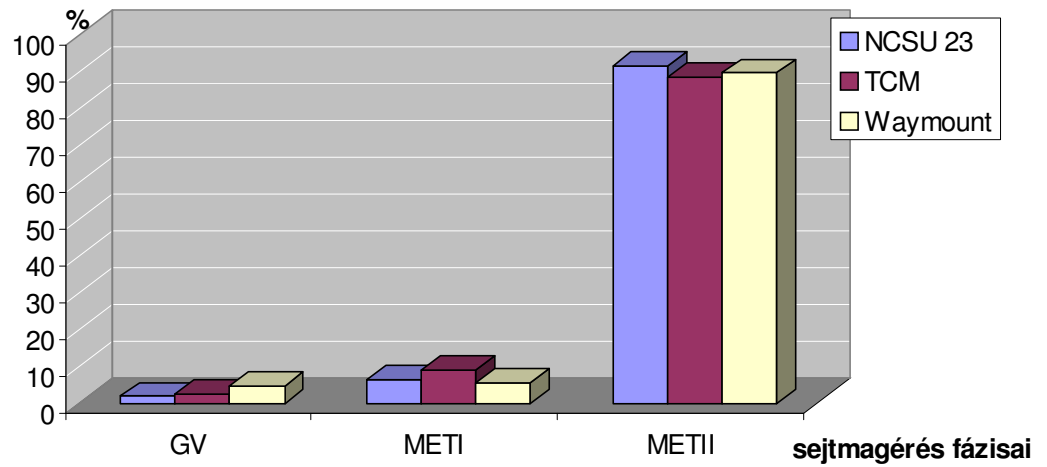
A sejtmagérés (GV=germinalis vesiculum, Met I=metafázis I, Met II metafázis II) követésére a petesejtek maturáltatás utáni fixálását követő aceto-orceines festést alkalmaztuk. A kapott eredményeket a következő táblázatban foglaltuk össze, ahol n a vizsgált petesejtek számát jelöli.

4. táblázat. A petesejtek magérése a különböző maturációs tápközegekben

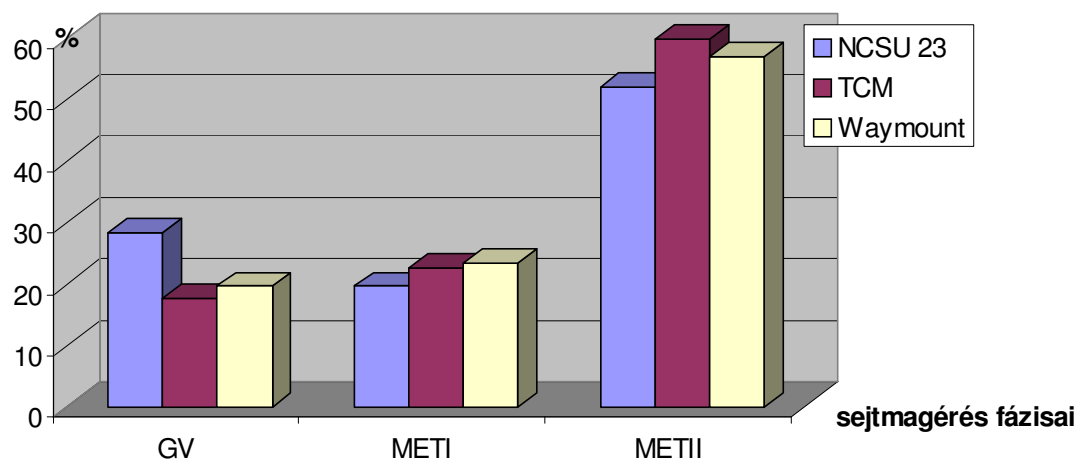
<b>Maturációs közeg</b>	<b>n</b>	<b>Petesejtek érési állapota (%)</b>		
		<b>GV</b>	<b>Met I</b>	<b>Met II</b>
NCSU23 + FF	105	1,90	6,60	91,42
NCSU23	102	28,40	19,60	51,96
TCM 199+ FF	110	2,70	9,09	88,18
TCM 199	102	13,72	26,47	59,80
Weymouth + FF	104	4,80	5,76	89,76
Weymouth	107	19,62	23,36	57,00

A 4. táblázat adatait értékelve megállapíthatjuk, hogy a folliculus folyadék kiegészítés nagymértékben hozzájárul a megfelelő magérés eléréséhez. Mindhárom alkalmazott táptalaj esetében a metafázis II. állapot elérésében szignifikáns különbség volt  $P < 0.05$  szinten. Ebben valószínű közrejátszik, hogy a tüszőfolyadék hozzáadása pozitívan hat a cumulus sejtek proliferációjára és tudjuk, hogy a petesejt és somatikus sejtek összehangolt működése eredményezi az oocyta fejlődését, és éretté válását az ovulációra.

A 10. és 11. ábra jól szemlélteti a különböző tápközegekben való oocyta sejtmag fejlődés különbségeit.

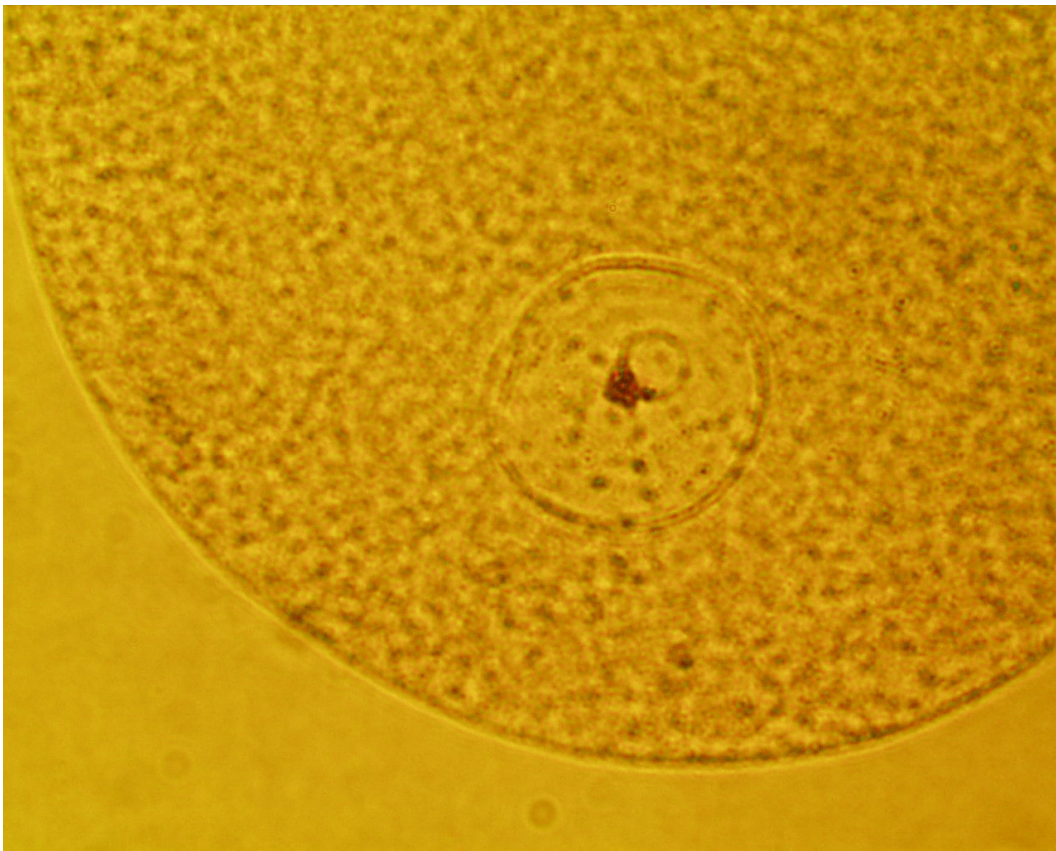


10. ábra. Petesejtek fejlődése 10% FF kiegészítés mellett különböző maturációs közegekben



11. ábra. Petesejtek fejlődése különböző maturációs közegekben

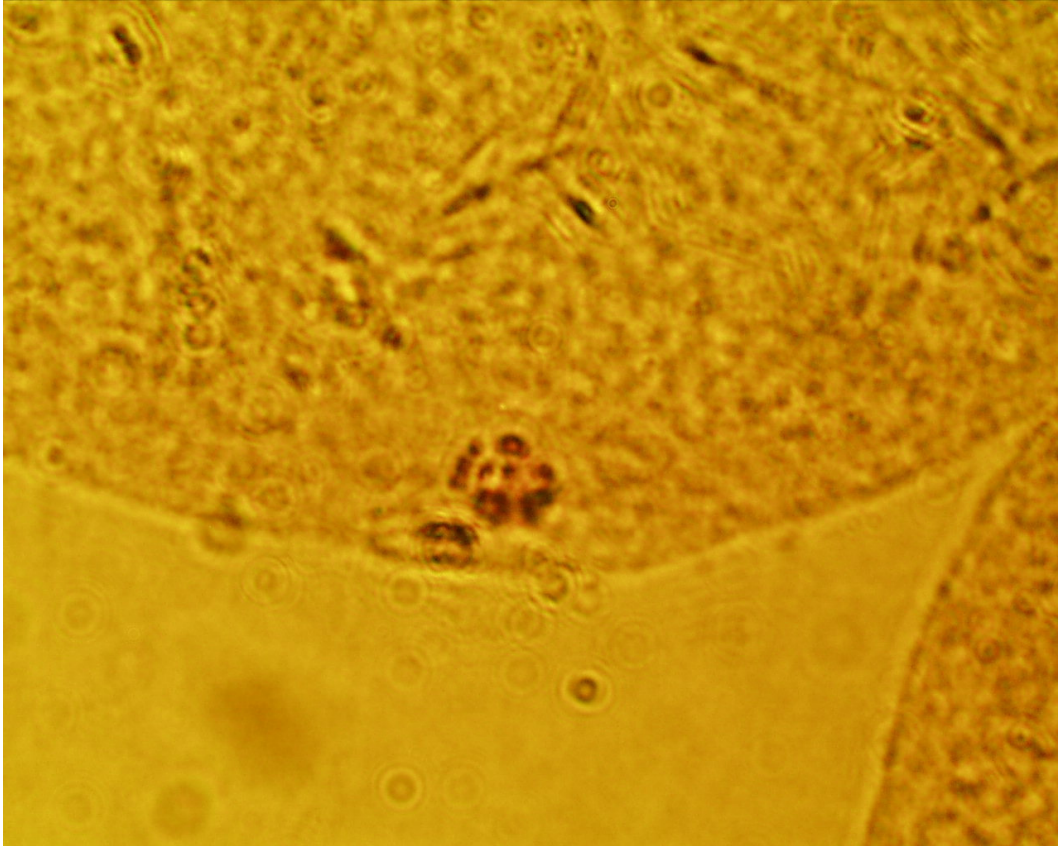
A különböző maturációs közegekben (FF nélkül) közel azonos arányban érték el a fejlődő petesejtek az ovulációra alkalmas Met II fejlettségi szintet (51,9; 59,8; 57 %). Jelentős különbség csak az NCSU tápfolyadékban tüszőfolyadék kiegészítés nélkül tenyésztve állt fenn, mert ekkor a petesejtek egy tekintélyes mennyisége (a vizsgált petesejtek 28,4%) nem indult fejlődésnek, és mindössze fele vált érett oocytává. A kapott eredmények harmonizálnak Yoshida és mts. [215] eredményeivel, akik két táptalaj (Waymouth és TCM 199) tüszőfolyadék kiegészítésének hatását vizsgálták.



1. fénykép. **Germinalis vesiculum állapotú petesejt**

Nagyítás: 200x

A germinalis vesiculum állapotú petesejtnél a sejtosztódás folyamata nem indult újra, a petesejt a meiózis profázisában maradt. Jól látható a citoplazmában a sejtmagmembrán és az összetömörödött cromatin állomány.



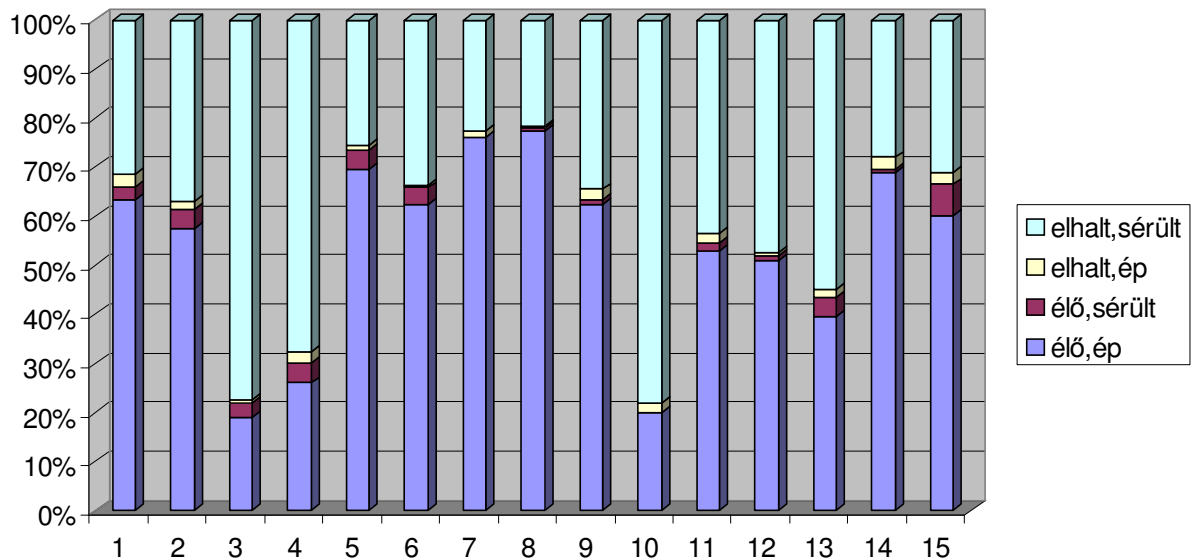
## 2. fénykép **Metafázis II állapotú petesejt**

Nagyítás: 200x

Az equatorialis síkba rendeződött metafázisos kromoszómák mellett közvetlenül jól kivehető az 1. sarkitest, mely az érett metafázis II. állapotú (secunder) oocyta jellemzője.

## 2. Mélyhűtött/visszaolvasztott kansperma életképességének vizsgálata

Az in vitro fertilizációhoz mélyhűtött sperma alkalmazása mellett döntöttünk, mert a mélyhűtés megváltoztatja a sperma membrán szerkezetét, mégis jól alkalmazható in vitro termékenyítésre, mint ezt többek között Abeydeera [1] kísérletei igazolták. Kísérleteinkben 15 kan termékenyítő anyagát tartalmazó négyszáz 0,25 ml-es műszalma volt felhasználható, amelyet az Országos Mesterséges Termékenyítő RT. Debreceni Állomása bocsátott a rendelkezésünkre. A spermiumok életképességének bírálatát a Kovács-Foote [109] spermafestési eljárással végeztük el. A vizsgálati eredményeket a 12. ábra szemlélteti.



12. ábra. Mélyhűtött/ visszaolvasztott spermiumok élő/elhalt festése

*elhalt, sérült:* elhalt spermium, acrosoma sérült/nincs

*elhalt, ép:* elhalt spermium, ép acrosoma

*élő, sérült:* élő spermium, acrosoma sérült/nincs

*élő, ép:* élő spermium, ép acrosoma

Az eredmények alapján a 8. sz kant választottuk ki, és ezt a termékenyítő anyagot használtuk az in vitro fertilizációs kísérletek túlnyomó többségénél, kivételt képezett

a különböző kanok fertilizációs képességének összehasonlító vizsgálatát célzó kísérleteink, valamint az USA-ban végzett vizsgálatok.

### **3. Különböző spermiumkoncentrációk alkalmazásának hatása a fertilizációra**

A sertés in vitro fertilizáció egyik legnagyobb problémája a [32] polispermia kialakulása. Feltételezhetően az in vitro termékenyítésre alkalmazott spermium koncentráció is befolyásolja a fertilizációs paraméterek alakulását. Maturációs közegnek 10% folliculus folyadék kiegészítést tartalmazó NCSU 23 tápközeget választva különböző spermium koncentrációk összehasonlító vizsgálatát végeztük el:  $1 \times 10^6$ ,  $5 \times 10^5$ ,  $2,5 \times 10^5$ , koncentrációjú spermiumok in vitro fertilizációs közegbe juttatásával. Az egyenként 50  $\mu$ l mTBM közegbe elhelyezett 30 hialuronidáz kezelt érett petesejthez 50  $\mu$ l különböző koncentrációjú spermiumot adtunk, és vizsgáltuk a különböző spermiumkoncentrációk petesejtek fertilizációs értékeire kifejtett hatását. A penetráció (PEN) megállapítása mellett megvizsgáltuk, hogy azokba a petesejtekbe, amelyekbe spermium bejutott, milyen arányban fordul elő, hogy egynél több spermium került be, és ennek meghatározásával adatokat kaptunk a polispermia (POL) arányára vonatkozóan, a hím pronucleus kialakulásának arányát (MPN) és meghatároztuk a petesejtekbe jutott átlagos spermium számot (spermium/oocyta =S/O). Az eredményeket az 5. táblázatban foglaltuk össze. Látható, hogy valóban a polispermia arányának csökkenéséhez vezet a kisebb spermium koncentráció alkalmazása (81,79; 58,18; 52,94%), de a kis spermium koncentráció használata együtt jár a penetráció arányának csökkenésével is, tehát a vizsgált petesejtek egy jelentős részébe (46,9%) nem jut be spermium  $2,5 \times 10^5$  spermium koncentráció alkalmazásakor. A penetrálódott petesejtekben a hím pronucleusok kialakulásának arányában nincs szignifikáns különbség  $P < 0,05$  szinten egyik spermakonzentrációnál sem (57,51; 63,63 53,24%), de az  $5 \times 10^5$  koncentráció alkalmazása abszolút értékben



több zigótát eredményezett. Feltűnően nagy különbség tapasztalható a petesejtekbe jutó átlagos spermium számot vizsgálva. Láthatjuk, hogy  $1 \times 10^6$  spermakonzentrációt alkalmazva ez az érték nagyon magas, közel nyolc spermium jutott minden petesejtbe, tehát a polispermia igen nagy mértékű. A másik két alkalmazott sperma koncentrációnál ez az érték lényegesen alacsonyabb 1,89 ill. 1,35. A vizsgált fertilizációs eredmények alapján a további kísérletekben az  $5 \times 10^5$  koncentráció alkalmazását láttuk megfelelőnek.

5. táblázat. A fertilizációs paraméterek arányának változása különböző spermium koncentrációknál

Sp/ml	n	PEN%	<i>POL%</i>	HPN%	S/O
$1 \times 10^6$	94	90,03±3,3 <sup>a</sup>	81,79±5,58 <sup>a</sup>	57,51±6,54 <sup>a</sup>	7,7±0,37 <sup>a</sup>
$5 \times 10^5$	89	80,90±4,22 <sup>ab</sup>	58,18±4,15 <sup>b</sup>	63,87±3,27 <sup>ab</sup>	1,89±0,13 <sup>b</sup>
$2,5 \times 10^5$	90	53,10±4,90 <sup>c</sup>	49,86±2,56 <sup>b</sup>	53,25±4,42 <sup>a</sup>	1,22±0,11 <sup>b</sup>

*Sp/ml*: alkalmazott spermium koncentráció

*n*: vizsgált petesejtek száma

*PEN%*: penetrálódott petesejtek aránya

*POL%*: azon penetrálódott petesejtek aránya, melyekbe egynél több spermium jutott be

*HPN%*: azon penetrálódott petesejtek aránya, melyekben hím pronucleus található

*S/O* átlagos spermiumszám/ petesejt

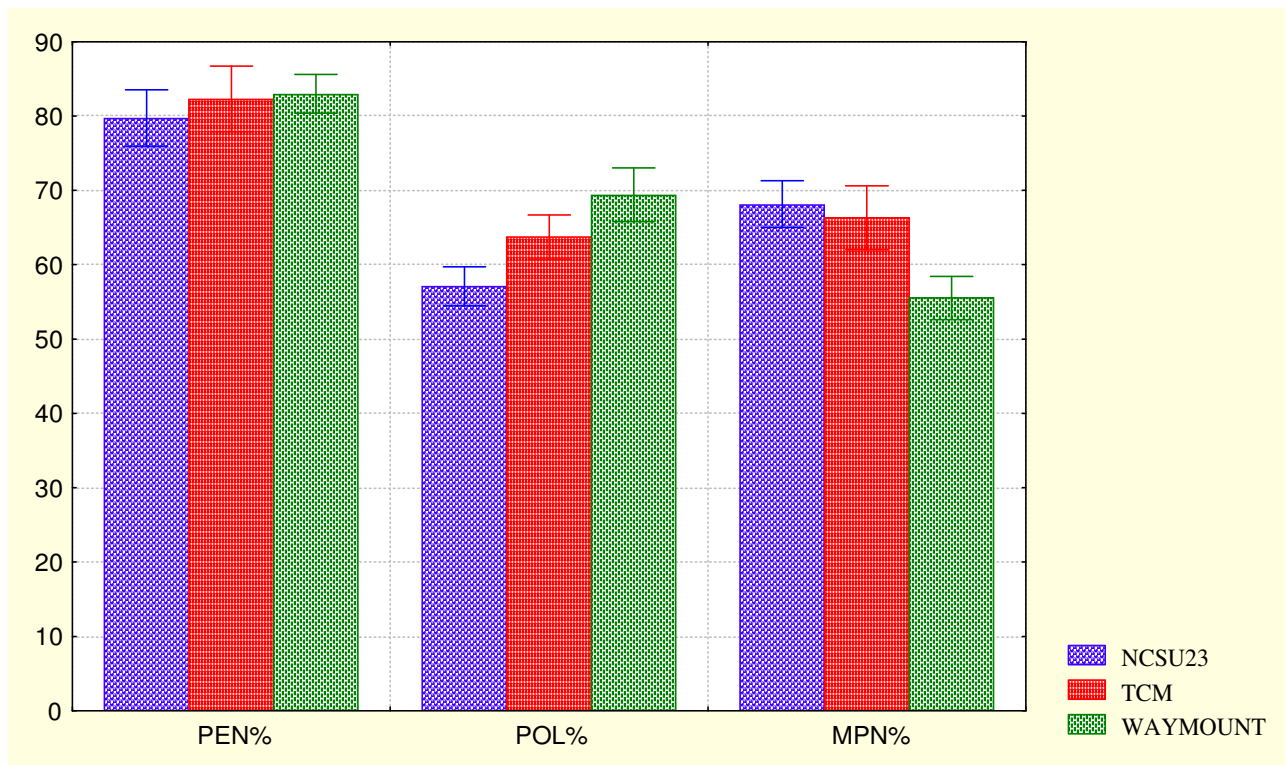
Minden oszlopban a különböző felső index értékek szignifikánsan különböző értékeket jelölnek ( $P < 0,05$ )

A kapott eredmények összevethetőek Abeydeera [1] kísérleteivel, bár abban a kísérletsorozatban a legkisebb alkalmazott spermiumkoncentráció nem  $2,5 \times 10^5$ ,

hanem  $1 \times 10^5$  volt. Az amerikai kutatók kísérleteiben a hím pronucleusok kialakulásának aránya lényegesen magasabb volt, és a petesejtekbe jutó spermiumszám átlaga lényegesen alacsonyabb.

#### **4. Különböző tápközegekben történő maturáltatás hatása a fertilizációra**

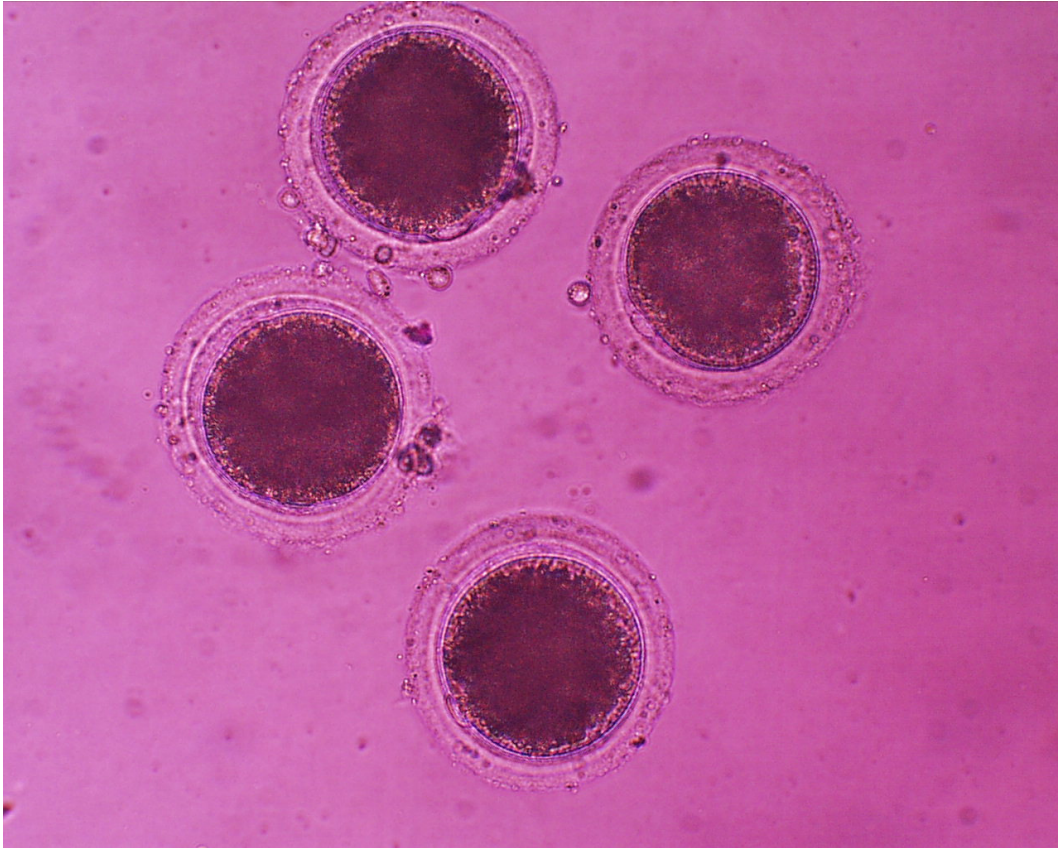
A következő kísérletekben arra kerestünk választ, hogy a különböző tápközegben való maturáltatás milyen mértékben befolyásolja az in vitro fertilizáció eredményességét. Az első kísérletsorozatban kapott eredmények alapján, ahol a különböző maturációs közegek 10% folliculus folyadék kiegészítése jó eredményeket hozott a petesejt magérés tekintetében, továbbiakban is alkalmaztunk tüszőfolyadék kiegészítést és azt vizsgáltuk, hogy a petesejtek citoplazmatikus érése mindegyik alkalmazott táptalajnál egyaránt megfelelőnek tekinthető-e. Ennek érdekében az első kísérletsorozatban említett módon az NCSU 23 táptalaj 1% aminosav és 0,1 mg/ml cystein, míg a TCM1 99 táptalaj 0,1mg/ml cystein kiegészítést kapott, így egyenlővé vált mindhárom alkalmazott táptalaj cystein tartalma. Maturáltatás után az érlelt petesejtek (a TCM 199 közegből 91, NCSU 23-ből 94, a Waymouth közegből 95 petesejt) in vitro termékenyítését végeztük el, melyhez ugyanazon kától származó mélyhűtött visszaolvasztott spermát használtuk. A termékenyítő anyagot  $5 \times 10^5$  végső koncentrációban juttatunk az mTBM fertilizációs közegbe.



13. ábra. **Különböző táptalajokban történő maturáltatás hatása a fertilizációs paraméterek alakulására**

A termékenyítési paraméterek közül a penetrációra (PEN%), polispermia (POL%) és hím pronucleus (MPN%) kialakulására vonatkozó adatokat a Statistica programban szerkesztett diagramokon a standard hiba ábrázolása is megvalósítható volt. A kapott eredmények varianciaanalízisét elvégezve azt tapasztaltuk, hogy a penetráció, valamint a polispermia viszonylatában  $P < 0,05$  szinten nincs szignifikáns különbség a maturáltatásra használt táptalajok között, azaz a citoplazmatikus érés feltételei egyaránt adottak mindhárom vizsgált táptalajnál. A hím pronucleus kialakulásának valószínűsége  $P < 0,05$  szinten szignifikánsan kisebb Waymouth táptalajban érlelésnél (56,2%) a kísérletben kapott eredmények alapján, mint az NCSU23 (68,7%) és TCM 199 (66,6%) táptalajoknál. A jelenség magyarázata

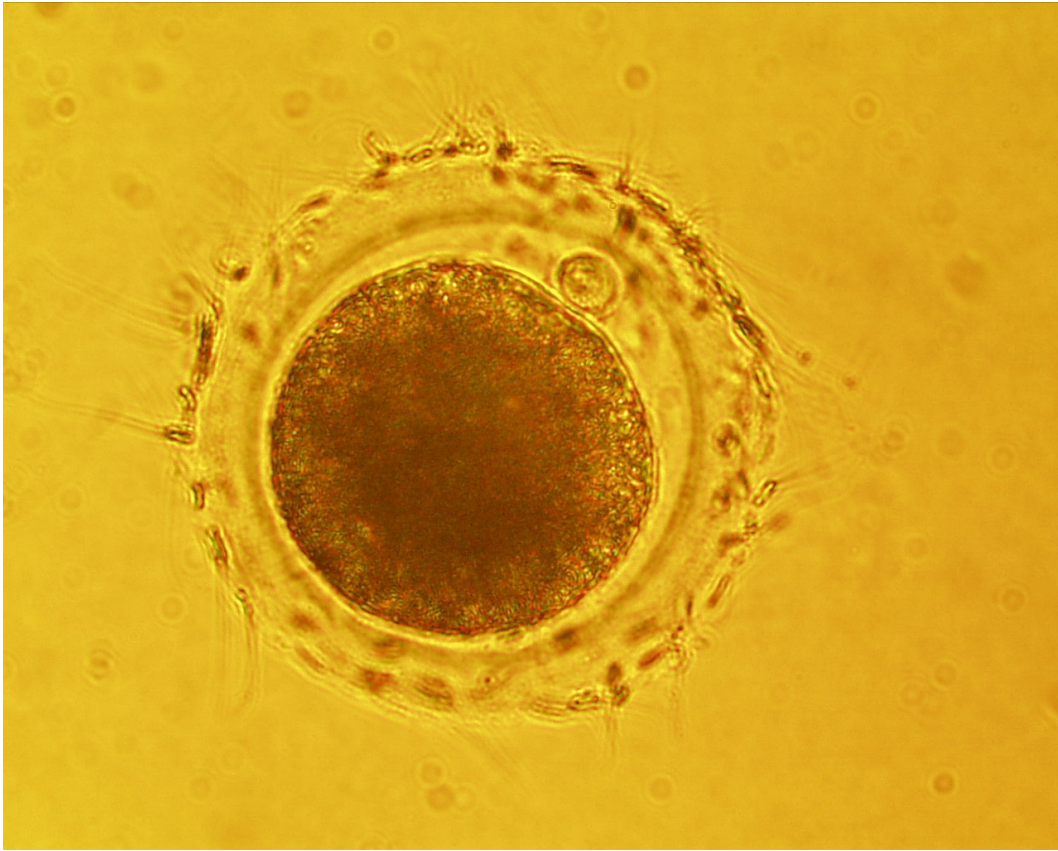
valószínű az, hogy bár a kiindulási cystein koncentráció mindhárom táptalajnál azonos volt, valamilyen oknál fogva a hím pronucleus kialakulásához fontos GSH tartalom (melynek mennyiségét jelen kísérletben nem határoztuk meg) kisebb volt a Waymouth táptalajban, mint az NCSU23 ill. TCM 199 közegekben.



### 3. fénykép. **Érett secunder oocyták**

Nagyítás: 100x

A képen látható, hogy hyaluronidáz enzimkezelés után petesejtek zona pellucidáján csak néhány cumulus sejt található. Az érett (metafázis II. állapotú) petesejtek citoplazmája egyenletes denzitású, a perivitellináris térben mindegyik oocytánál jól látható a sarkitest.



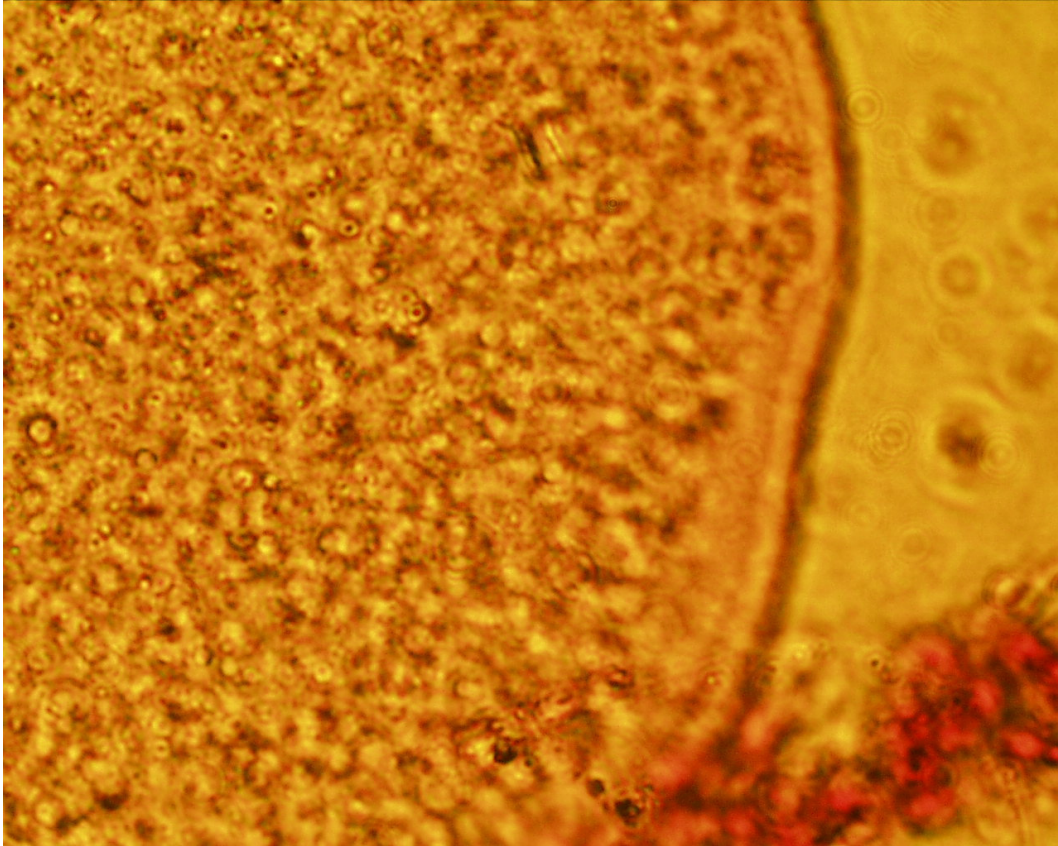
4. fénykép. **Termékenyült zigóta**

Nagyítás: 100x

A fertilizáció után a zona pellucida külső felszínén látható számos spermium, amely nem tudott átjutni a zonán. A fertilizáció eredményességét jelzi, a perivitellinális térben látható három sarkitest. A fertilizációs paraméterek pontosabb meghatározásához azonban nem elég csak sarkitesteket jelenlétéről meggyőződnünk, hanem tisztában kell lennünk azzal is, hogy fellépett-e polispermia, létrejöttek-e a



hím és női pronucleusok. Ennek meghatározásához szükséges a fertilizáció utáni zigóták orceines festése.



5. fénykép. **Termékenyült, festett zigóta**

Nagyítás:300x

A citoplazmában a női pronucleus mellett az alakuló hím pronucleus látszik a hozzátartozó spermium farokkal

## 5. In vitro fertilizáció különböző kanok spermájával

Az in vitro fertilizációs rendszerek egyik jelentős felhasználási területe lehet a közeljövőben, hogy a különböző termékenyítő anyagok in vitro tesztelésére szolgálhatnak. Kísérleteket tervezünk annak megállapítására, hogy az in vitro fertilizációs eredmények milyen összefüggésben vannak az in vivo fertilizációs képességgel. A spermafestési eljárásokkal kombináltan alkalmazva felválthatják a ma még általánosan alkalmazott motilitási bírálatot, bár megvalósításuk sokkal bonyolultabb annál. Az éretlen petesejtek sperma termékenyítőképességének tesztelésére E. Martinez [117] eredményeit ismerjük. A spermafestési értékelések alapján kiválasztottunk három kant, amely várhatóan jó fertilitási értékekkel rendelkezik (1.-8. sz., 2.-1.sz, 3.-15. sz. kan). A maturáltatást 10% folliculus folyadék kiegészítés mellett NCSU 23 közegben végeztük. A hormon-kiegészítést követő 44 óra múlva a fertilizációt a már ismertetett módon végeztük el a három különböző kan spermáját egyaránt  $5 \times 10^5$  végső koncentrációban jutattuk a fertilizációs médiumba. A kapott eredményeket a 6. táblázatban foglaltuk össze:

6. táblázat A fertilizációs paraméterek alakulása különböző kanok spermájával végzett IVF után

Kan	n	PEN%	<i>POL%</i>	HPN%	S/O
1	97	80,41±3,87 <sup>a</sup>	61,38±2,43 <sup>a</sup>	63,85±4,03 <sup>a</sup>	2,01±0,16 <sup>a</sup>
2	92	51,96±2,66 <sup>b</sup>	60,22±3,24 <sup>a</sup>	70,44±4,97 <sup>a</sup>	2,52±0,37 <sup>a</sup>
3	93	76,16±4,83 <sup>a</sup>	80,19±4,85 <sup>b</sup>	49,36±6,05 <sup>b</sup>	7,73±0,49 <sup>b</sup>

Minden oszlopban a különböző felső index értékek szignifikánsan különböző értékeket jelölnek (P<0,05)

Az adatokat értékelve megállapíthatjuk, hogy az általunk kiválasztott és a kísérletek túlnyomó többségénél alkalmazott 1. kan spermája, a nagy penetráló képesség mellett (80,41%) aránylag nagy a hím pronucleus kialakulásának aránya (63,85%) és a sejtenkénti spermiumszám nem magas, átlag 2 spermium petesejtenként. A 2. kan penetráló képessége szignifikánsan kisebb (51,96%) a bejutó kevesebb spermiumból azonban az előbbihez közeli arányban alakultak ki a hím pronucleusok (70,44%). Az előmag kialakulása az első kan esetében abszolút értékben magasabb, mint a másodikonál. A harmadik kan penetráló képessége közel azonos az elsővel (76,16%), viszont szignifikánsan több petesejt polispermikus (80,19%), mint az első és második kan spermájával termékenyítve, és a petesejtenkénti spermiumszám is sokkal magasabb (7,73). A kísérletből látszik, hogy ebben a rendszerben vizsgálva lényeges különbség adódik a különböző spermiumok között, de annak igazolásához, hogy ez milyen mértékben függ össze az *in vivo* termékenyítőképeséggel további vizsgálatok szükségesek

## **6. Különböző *in vitro* fertilizációs közegek összehasonlítása**

A sertés *in vitro* fertilizációval foglalkozó laboratóriumokban a különböző érlelő médiumok alkalmazása mellett más és más fertilizációs közeget használnak a termékenyítésekhez is. A következő kísérletekben arra kerestünk választ, hogy befolyásolja-e a különböző *in vitro* fertilizációs közegben történő termékenyítés a fertilizációs eredmények alakulását. Mindezek vizsgálatához két különböző közegben (mTBM és TCM 199) végeztük el a módosított NCSU 23 táptalajon történő maturáltatás utáni termékenyítést. A kísérlet során kapott eredményeket a 7. *táblázatban* közöljük.



7. táblázat. A fertilizációs paraméterek alakulása két különböző IVF közegben

IVF közegek	n	PEN%	POL%	HPN%	S/O
mTBM	90	81,20±3,69	56,28±3,24	69,98±3,94	2,04±0,14
TCM199	90	84,43±3,15	76,19±3,91	70,91±3,12	2,47±0,27

A két különböző IVF közegben történő termékenyítés eredményeit összevetve láthatjuk: annak ellenére, hogy a két közeg kémiai összetétele lényegesen különbözik és jelentős a térfogat különbség is a két módszer alkalmazásakor (mTBM esetében 30 érett petesejtet összesen 100 µl oldatban tenyésztünk, míg TCM 199-nél 2 ml oldatban van ugyancsak 30 petesejt), szignifikáns különbség ( $P < 0,05$ ) csak a polispermia értékében adódott (56,28% az mTBM, míg 76,19% a TCM 199 fertilizációs közegben). Mindkét fertilizációs közegben a 8 sz. kan mélyhűtött spermáját használtuk, a végső koncentráció  $5 \times 10^5$  spermium/ml volt. A kísérleti eredményekből következően mindkét termékenyítő közeg jól alkalmazható in vitro fertilizációra.

### 7. In vitro fertilizáció alatti kokultiválás

Spanyolországban az University of Murcia Department of Animal Biotechnology fakultásán eltöltött tanulmányutam során sikerült egy petevezető kokultivációs módszert elsajátítanom. Az ott végzett kísérletek eredményei azt mutatták, hogy a polispermia csökkenthető az oviductus sejtekkel történő együtt tenyésztéssel. Ennek magyarázata, hogy a petevezetőben levő proteoglikánok vetélkednek a petesejt felületén levő spermiumkötő helyekért, és ez tovább csökkenti a behatolni képes

spermiumok számát, és így közelíthetnek a Hunter [85] által ideálisnak tartott arányhoz. Mindezek igazolására a következő kísérletekben megvalósítottuk a petevezető egysejt-rétegen (oviductus monolayeren) való termékenyítés, vele párhuzamosan kontrollként kokultiváció nélküli fertilizációt hajtottunk végre TCM 199 termékenyítő közegben. A kísérletek eredményeit a 8. táblázat mutatja.

8. táblázat. A fertilizációs paraméterek alakulása kokultiválással/kokultiválás nélkül

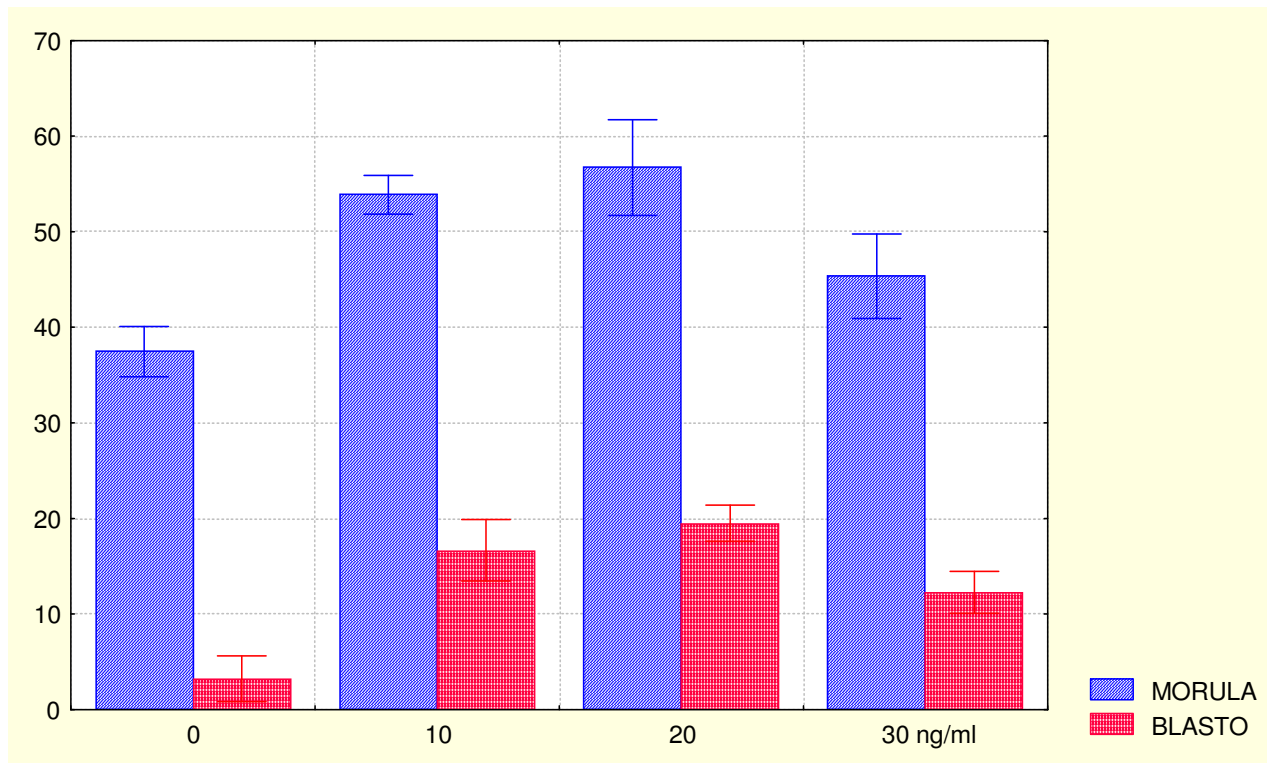
	n	PEN%	POL%	HPN%	S/O
POEC+	98	90,91±2,04	51,84±3,80	76,78±5,74	1,63±0.15
POEC-	96	79,22±3,63	63,55±3,07	75,01±2,32	2,29±0,26

POEC+: oviductus sejtekkel történő cocultiválás

A kísérlet eredményeit értékelve megállapíthatjuk, hogy cocultivált oviductus sejteket tartalmazó közegben végrehajtott fertilizációkor a spermiumok penetrációs képessége nőtt (90,91% ill. 79,21) a polispermia szignifikánsan csökkent  $P < 0,05$  szinten (51,84% ill. 63,55%). A cocultiválás nem befolyásolta a hím pronucleusok kialakulásának arányát (76,78% ill. 75,01%), jelentősen csökkent az egy petesejtbe jutott spermiumok aránya (1,63 ill. 2,29). Az oviductus sejtekkel való cocultiválás előnyös a fertilizáció sikeressége szempontjából, de elég bonyolult eljárás, nehéz a petevezető monolayer létrehozása, fenntartása, valamint annak biztosítása, hogy megfelelő korú egyrétegű sejtenyészet álljon rendelkezésünkre a fertilizáció időpontjában.

## **8. Különböző növekedési faktorokkal történő maturáltatás hatása az embriók fejlődésére**

A Missouri-Columbia Egyetemen B.N. Day laboratóriumában eltöltött tanulmányutamon győződtem meg először, hogy a szarvasmarha in vitro fertilizációs rendszerekben fellelhető tendenciához hasonlóan [43], a sertésnél is lehetőség lehet a maturáció során, az addigi gyakorlatban a legtöbb laboratóriumban (így a mi kísérleteinkben is) alkalmazott, kokultiváció kiküszöbölésére. Tudvalevő, hogy ezeket a kísérleteket megelőzően a maturációs rendszerekben vagy tüsző fal-sejtekkel való együtt tenyésztést alkalmaztak [2, 120], vagy folliculus folyadék kiegészítést [1, 55, 140, 216]. A Columbia Egyetemen maturáltatásra TCM 199 táptalajt használtak. Tudva azt, hogy a különböző növekedési faktoroknak milyen nagy szerepe van a petesejtek érésében [4, 23, 36, 105, 126] különböző koncentrációjú EGF kiegészítést alkalmaztak, és nagyon jó embriótenyésztési eredményeket kaptak. Bekapcsolódva a laboratóriumban folyó munkákba különböző koncentrációjú EGF kiegészítést alkalmaztam a maturációs közegbe, és ennek hatását vizsgáltam a sertés zigóták fejlődésére. Az in vitro fertilizáció mTBM közegben történt granulált és visszaolvasztott  $2 \times 10^5$ /ml koncentrációjú kansperma felhasználásával. A petesejtek 6 órát voltak coincubálva a spermiumokkal, majd hat napos tenyésztés következett 400  $\mu$ l NCSU 23 médiumban 0,4% BSA kiegészítés mellett. Az eredményeket a 14. ábrán jelenítettem meg, melyet a Statistica programban szerkesztettem meg.



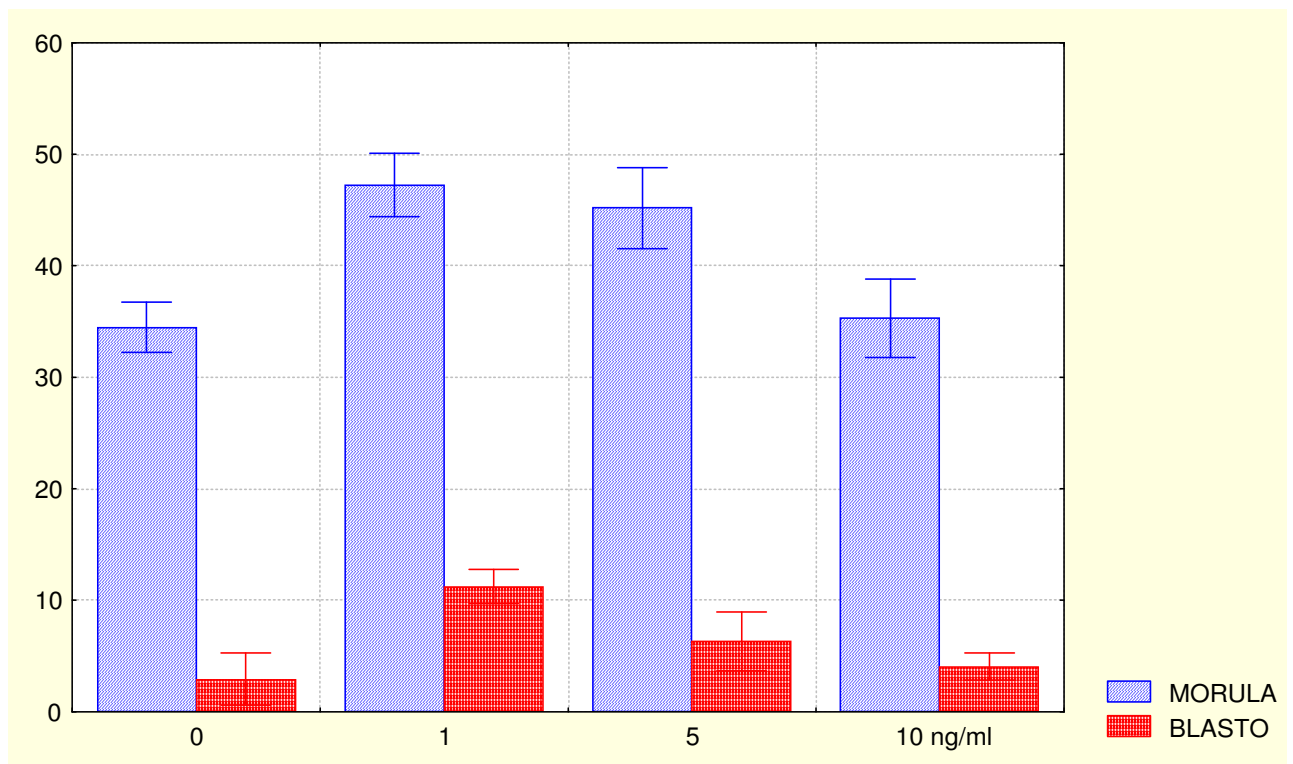
#### 14. ábra Maturáltatás alatti különböző EGF koncentrációk hatása az embriók in vitro fejlődésére

Az y tengelyen a fertilizált zigóták %-ban ábrázoltuk a 6 napos tenyésztés végére morula, illetve blastocysta (blasto) állapotot elért embriók arányát.

A kontroll esetében  $n=93$ , 10ng/ml-nél  $n=89$ , 20ng/ml-nél  $n=92$  és 30ng/ml esetében  $n=91$  volt a felhasznált fertilizált zigóták száma összesen. A kísérlet adatait értékelve megállapítható, hogy az alkalmazott EGF koncentrációk elősegítették az embriók in vitro fejlődését. A kontrollhoz (35,48) viszonyítva, mind a morulák kialakulásának aránya (56,66; 58,06; 45,35), mind a blastocysták aránya (16,66; 19,35; 13,33) magasabb volt. Ez utóbbi esetben a kontroll értéke 3,03 volt, amely  $P<0,05$  szinten szignifikáns különbséget jelent. Az eredmények összevethetők a B.N. Day

laboratóriumban dolgozó L. Abeydeera [4] kísérleti adataival, azonban abban az esetben a blastocysták aránya lényegesen magasabb volt közel 40%.

Olvasva az EGF növekedési faktorról végzett kísérleti eredményeiről [4], a tulajdonképpeni oka, hogy felkerestem B. N. Day laboratóriumát az volt, hogy szerettem volna, és továbbra is egyik fontos kutatási célom, behatóbban tanulmányozni az NGF növekedési faktor in vitro maturációra fertilizációra és embriófejlődésre gyakorolt hatását. Ezen az úton az indított el, hogy a milánói ICAR konferencián hallottam Mattioli feltételezését, hogy az NGF szerepelhet secunder messengerként az LH hullámot követő petesejt meiotikus osztódás újraindításában. Akkor vetődött fel bennem a gondolat, hogy legegyszerűbben úgy lehetne a feltevést igazolni, ha közvetlenül a maturációs közegbe különböző koncentrációjú NGF alkalmazásával vizsgálánk ennek hatását a petesejt érlelésre és a zigóta további fejlődésére. A kísérleteket az amerikai laboratóriumban megkezdtém, és mivel nem állnak rendelkezésre megfelelő adatok arra vonatkozóan, hogy milyen koncentráció lehet hatásos, először a kontroll mellett az 1, 5, 10 ng/ml koncentráció alkalmazása mellett döntöttem. Az eredmények a 15. ábrán láthatók. A kontrollnál n=96, 1 ng/ml-nél n=89, 5 ng/ml-nél n=95 és 10 ng/ml esetében n=96 volt a felhasznált fertilizált zigóták száma összesen.

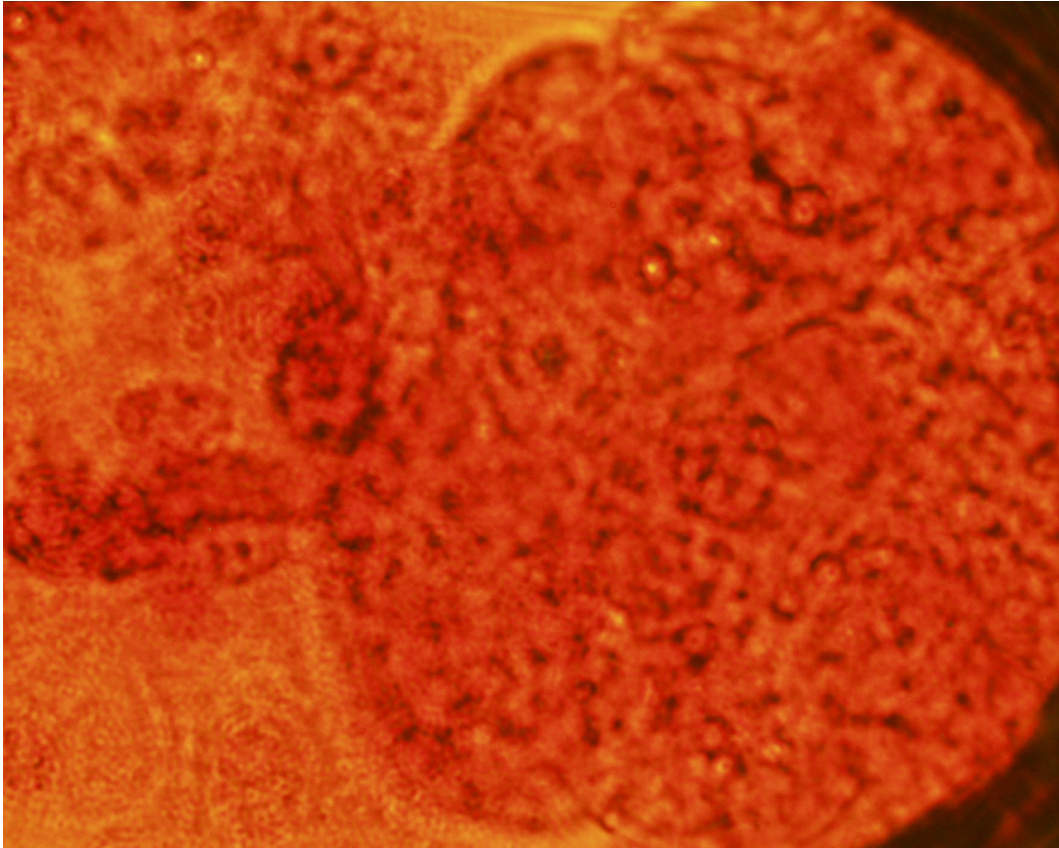


**15. ábra. A maturáltatás alatti különböző NGF koncentrációk hatása az embriók in vitro fejlődésére**

Az y tengelyen az összes termékenyült zigóta %-ban ábrázoltuk a fejlődött morulák ill. blastocysták (blasto) arányát.

A 15. ábra adatait értékelve úgy tűnik, hogy a kontrollal összehasonlítva mind a fejlődő morulák számában (kontroll:37,32; 1 ng/ml:47,23; 5 ng/ml:41,15; 10ng/ml: 31,06%), mind a blastocysták arányában (kontroll: 2,94; 1 ng/ml: 13,33; 5 ng/ml: 9,67; 10 ng/ml: 4,06) az alkalmazott NGF koncentrációk előmozdították a petesejt érését, és ennek következtében az embriófejlődés hatékonyságát. A különbségek azonban nem szignifikánsak. Sajnos a külföldön töltött idő csak az eredetileg választott koncentrációval végzett kísérletek háromszori ismétlését tette lehetővé.

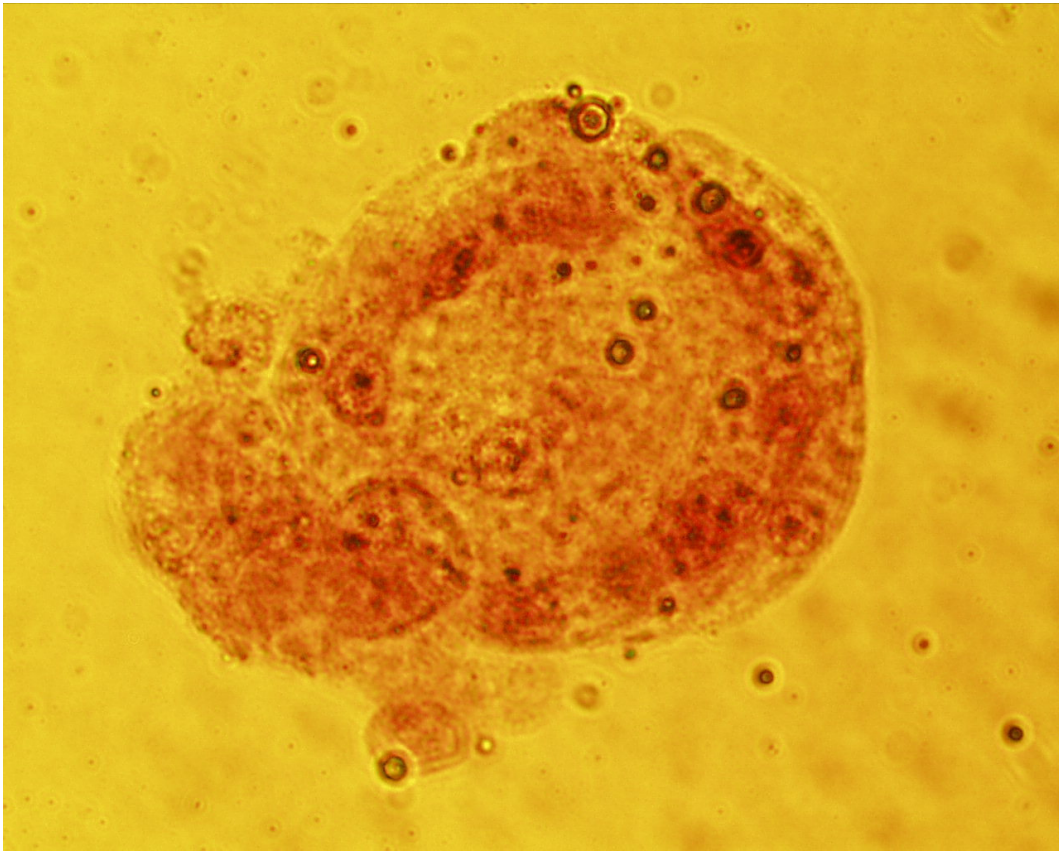
Mivel a növekedési faktorok, és különösen az NGF, rendkívül drágák a kísérletek folytatására csak a jövő évben nyílik lehetőségem, amikor egy, a csoportunk által elnyert, 4 éves OTKA pályázat anyagi keretei lehetővé teszik a vegyszer megvásárlását.



6. fénykép **Orceinnel festett két compact morula**

Nagyítás: 100x

A kicsit túlfestett preparátumon nehezen ismerhetők fel a blastomerek kontúrjai, megnehezítve ezzel a sejtek számolását.



7. fénykép. **Hatching előtt lévő, orceinnel festett, blastocysta**

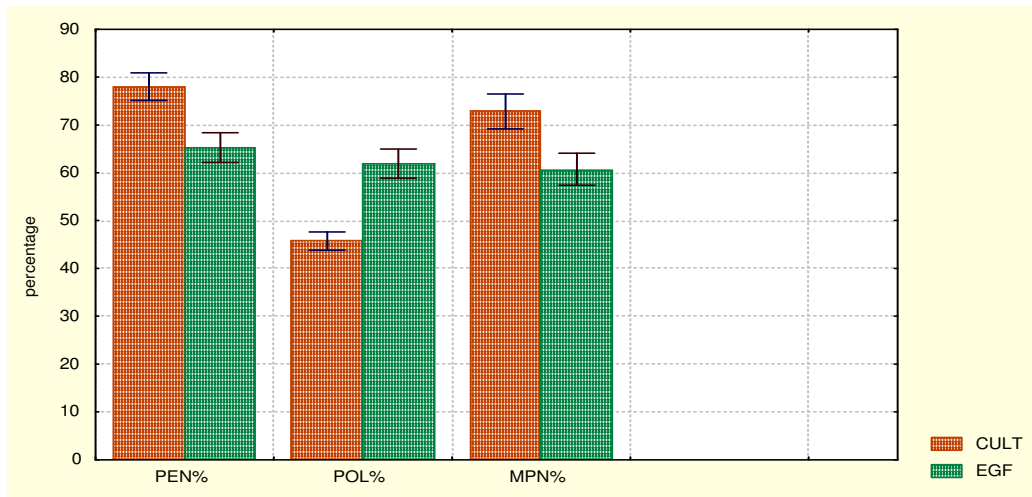
Nagyítás: 100x

A compact morula és blastocysta állapot morfológiai különbségei jól láthatók a két fénykép összevetésével. A sejtek kontúrjai élesek, a preparátum nem festődött túl. A sejtek pontos számának meghatározásához természetesen különböző mélységekben levő sejtek összeszámolása szükséges.



## 9. A maturáció alatti cocultiválás FSP-vel összehasonlítva az EGF kiegészítéssel

A kísérleteket olyan irányban folytattuk tovább, hogy megvizsgáltuk, az EGF kiegészítés valóban helyettesítheti-e a tüszősejt darabokkal (FSP= Follicular Shell Pieces) végzett kokultivációt. A kísérlet eredményeit a következőkben mutatom be.



16. ábra. A maturáció alatti kokultiválás és az EGF kiegészítés hatása a fertilizációs paraméterek alakulására

Ebben a kísérletben a maturációs közeg TCM 199 volt, melyet vagy 6 folliculus somatikus sejt darabokkal (FSP) vagy 10 ng/ml EGF-fel egészítettünk ki. A petesejtek sejt magérésének ellenőrzésére a kiindulási petesejtek 20%-át használtuk fel. Megállapítottuk, hogy a két eltérő kezelés nem okozott szignifikáns különbséget a sejt magérésben, mivel a kokultiválás 90% ban eredményezett Met II. állapotú oocytákat, míg az EGF kiegészítés 87%-ban. A maturáltatás után (somaticus sejtekkel együtt tenyésztve n=92, tüszősejtek nélkül n=89) a fertilizációt mTBM közegben valósítottuk meg. A fertilizációs paraméterek meghatározása orceines

festés után történt. Az eredményeket értékelve megállapíthatjuk, hogy a somatikus sejtekkel történő kiegészítés hatására a penetrálódott petesejtek aránya 78%, míg EGF kiegészítéssel 65,5%; míg a polispermia 45,26% illetve EGF kiegészítéssel 62,1% volt, az eredmények  $P < 0,05$  szinten szignifikáns eltérést mutatnak. A hím pronucleusok arányában a somatikus sejtekkel történő együtt tenyésztés 73,3%, míg EGF kiegészítés mellett 60,35%, mely különbség nem szignifikáns.

## KÖVETKEZTETÉSEK

- A petesejtek NCSU 23, TCM 199 és Weymouth maturációs közegekben történő érlelésekor a folliculus folyadék kiegészítés nagymértékben hozzájárult a megfelelő magéréshez. Ennek magyarázata, hogy a tüszőfolyadék hozzáadása pozitívan hat a cumulus sejtek proliferációjára és a petesejtben lejátszódó folyamatokra, melyek végül az oocyta éretté válását eredményezik.
- A különböző spermiumkoncentrációk fertilizációs paraméterekre gyakorolt hatását tekintve megállapítható, hogy a polispermia csökkenéséhez vezet a vizsgált legalacsonyabb  $2,5 \times 10^5$  spermiumkoncentráció alkalmazása, de ez együtt jár a penetráció mértékének csökkenésével is. A vizsgált legmagasabb spermiumkoncentrációnál ( $1 \times 10^6$ ) a polispermia nagyfokú volt, és ezzel összefüggésben a petesejtbe jutó átlagos spermiumszám is magas volt. A további kísérleteknél az  $5 \times 10^5$  spermiumkoncentráció alkalmazása látszott célszerűnek.
- Különböző tápközegekben való maturáltatás fertilizációs paraméterekre gyakorolt hatását vizsgálva csak a hím pronucleus kialakulásának arányában volt lényeges eltérés a vizsgált táptalajok között. A vizsgált maturációs közegek kindulási cisztein koncentrációja azonos volt, a Weymouth táptalajban a hím pronucleus kialakulása szempontjából fontos GSH tartalom valószínűleg mégis kisebb volt, mint az NCSU 23 és TCM 199 táptalajokban.
- In vitro fertilizációt végezve különböző kanok spermiumaival megállapítható, hogy az adott kísérleti elrendezésben vizsgálva különbség adódott a különböző

kanok termékenyítő anyagai között, de további vizsgálatok szükségesek annak igazolására, hogy ez általánosnak tekinthető-e és milyen szoros az összefüggés az in vivo termékenyítőképeséggel.

- A vizsgált TCM 199 és mTBM közeg egyaránt alkalmasnak bizonyult fertilizációs közegként való felhasználásra.
- A petevezető egyrétegű sejtenyészeten megvalósított in vitro fertilizáció esetében a vizsgált zigótákban a polispermia és a petesejtenkénti spermiumszám csökkent a kontrollhoz viszonyítva.
- Különböző koncentrációjú EGF és NGF növekedési faktorokat a maturációs közegbe juttatva és a fertilizáció után az embriók fejlődését vizsgálva azt tapasztalható, hogy az alkalmazott koncentrációk elősegítették az embriók fejlődését.
- A maturációs közeg FSP, illetve EGF kiegészítésékor bár mindkét maturációs közeg alkalmas volt a petesejtek érésének biztosítására, a tápközeg tüszőfal-sejtekkel történő kiegészítésekor a petesejtek maturációs és fertilizációs képessége nagyobb volt.

## ÚJ KUTATÁSI EREDMÉNYEK

- A petesejtek maturáltatás alatti kokultiválása tüsző szomatikus sejtekkel összehasonlítva az epidermal growth factor (EGF) kiegészítéssel azt mutatja, hogy az EGF-nek jelentős szerepe van a petesejtérés és későbbi embriófejlődés szempontjából, de a folliculus fali sejtek még egyéb növekedési faktorokat (IGF, NGF) és más, az érés szempontjából fontos anyagokat is kiválasztanak, amely teljesebbé teszik az érési folyamatot.
- A különböző növekedési faktorokkal történő maturáltatás hatása a sertés embriók fejlődésére igazolta, hogy az EGF kiegészítés elősegíti a petesejtek citoplazmatikus és magérését.
- Az NGF növekedési faktor a kísérleti eredmények alapján szintén elősegíti a petesejtek maturációját. Amennyiben beigazolódik az NGF szerepe a meiózis újraindításában ez újabb bizonyítéka lesz a neuroendokrin integrációnak.

## JAVASLATOK

- A sertés petesejtek maturációjának további tanulmányozása, az érésben részt vevő faktorok szerepének vizsgálata.
- A polispermia elkerülésének egyik módja a spermium petesejtbe juttatása manipulációs úton. A spermiumot a petesejt zona pellucidája alá a petesejt sejtthártyájának felszínére, vagy közvetlenül a citoplazmába juttathatók. Csoportunk megkezdte kísérleteit ezen a területen.
- A polispermia kiküszöbölésének egy másik lehetősége a fertilizációs idő jelentős csökkentése. További vizsgálatokat tervezünk a fertilizáció hatékonyságának javítására ezen az úton.
- A jól működő in vitro fertilizációs rendszer hasznosítható különböző kanok friss és mélyhűtött termékenyítő anyagának várható fertilizációs értékének in vitro beclésre.
- Az in vitro előállított secunder oocyták forrásai lehetnek a nukleáris transzfer kísérletekhez szükséges enukleált petesejteknek. Kísérleteket tervezünk a germinális őssejtek transzferének megvalósítására.
- Az NGF növekedési faktor szerepének mélyebb vizsgálata.
- A kísérleti eredmények, illetve az új tudományos eredmények lehetőséget kínálnak a törzstenyészetek állatállományának nemesítéséhez és nukleusz tenyészetek kialakításához.

# ÖSSZEFOGLALÁS

## *Bevezetés*

Az állattenyésztésben egyre bővül azon területeknek az aránya, ahol a korszerű biotechnológiai módszerek alkalmazása szükséges. Az összehasonlító géntérképezési eredmények alapján felértékelődött a sertés in vitro embrió manipulációs kutatások jelentősége. Világszerte számos kutatócsoport próbálkozik transz-génikus sertés előállítással xenotranszplantációs, emberi betegségek modellállataiként való hasznosítása érdekében.

A sertés petesejtek in vitro érlelésével morfológiailag látszólag teljesen érett petesejtek állíthatók elő, de az elégtelen mag és citoplazmatikus érés következtében az in vitro fertilizáció hatékonysága kicsi, nagyfokú a polispermia és elégtelen az embriók fejlődése. Igazolt, hogy a tüszőfolyadékban különböző ágensek halmozódnak fel, melyeket a tüsző szomatikus sejtek termelnek, és ezek befolyásolják a petesejtek érését. Az egyik legizgalmasabb kutatási terület napjainkban a különböző növekedési faktorok hatásának vizsgálata.

## *Célkitűzés*

Egy működő in vitro fertilizációs rendszer létrehozása, a meiózis újraindítási folyamatának mélyebb megértése.

## *Anyag-módszer:*

A vizsgálatokhoz vágóhídi petefészekből nyert cumulus-oocyta komplexeket (COC) használtam, amelyeket mikroszkópos bírálat és szelekció után különböző maturációs közegekben (TCM 199, Waymouth, NCSU 23) érleltem. Az NCSU 23 táptalaj 1% esszenciális aminosavas, illetve a TCM 199 és NCSU 23 médiumok 0,1 mg/ml ciszteines kiegészítése volt szükséges. Minden vizsgált

táptalajnál a 10% folliculus folyadék kiegészítés hatását is elemeztem. A TCM 199 táptalaj szomatikus sejtdarabokkal (FSP) történő kokultiválását is vizsgáltam. Az érlelés elősegítéséhez 10 NE PMSG és 10 NE HCG hormon kiegészítést alkalmaztam.

Maturáltatás után a cumulus sejteket 0.1% hyaluronidase enzim segítségével távolítottam el. Az érett petesejteket mTBM, illetve TCM 199 közegben fertilizáltattam mélyhűtött/visszaolvasztott termékenyítőanyaggal 1mM koffein és 0,1% BSA, vagy kalcium laktát kiegészítése mellett. TCM 199 közegben termékenyítve értékeltem a petevezető egyrétegű sejttenyészetben történő kokultiválás hatását is.

A maturáltatás, majd az in vitro fertilizáció után 12 órával a petesejteket illetve zigóták tárgylemezen voltak rögzítve és fixálva 48-72 óráig friss 1:3 ecetsav:etanolban, szobahőmérsékleten, 1% orceinnel festve, melyet előzetesen 45% ecetsavban oldottam. Inverz mikroszkóppal 200-400x nagyítás mellett vizsgáltam a sejtmagérés fázisait, illetve a fertilizációs paraméterek alakulását. A petesejtek akkor tekinthetők penetrálódottaknak, ha egy vagy több fellazult spermium fej és/vagy hím pronucleus található a citoplazmában, a hozzátartozó spermium farokkal. A penetráció (PEN) megállapítása mellett meghatároztam, hogy azokba a petesejtekbe, amelyekbe spermium bejutott, milyen arányban fordult elő, hogy egynél több spermium került be és ezzel adatokat kaptam a polispermia (POL) arányára vonatkozóan. Meghatároztam a petesejtekbe jutott átlagos spermium számot (spermium/oocyt =S/O), és a hím pronucleus kialakulásának arányát (HPN).

A kísérleteket három ismétlésben végeztem el. Az adatok átlagértékeit és szórását az Excel program segítségével határoztam meg. A kapott eredmények egytényezős varianciaanalíziséhez a Statistica program ANOVA/NANOVA részét használtam fel.

### *Eredmények és további feladatok*

A vizsgált különböző maturációs közegekben érlelt petesejtek orceines festésével igazolódott, hogy a folliculus folyadék kiegészítés esetében, mindegyik vizsgált



maturációs médiumban a petesejtek közel 90%-a elérte metafázis II állapotot. Tüszőfolyadék kiegészítés nélkül a vizsgált petesejtek 52,0%-a (NCSU 23), 57,0%-a (Waymouth) illetve 59,8%-a (TCM 199) érte el ugyanezt a fejlettségi állapotot. Az NCSU 23 közeg alkalmazásakor a petesejtek közel 30%-a germinalis vesiculum fázisban maradt.

Vizsgálva a  $2,5 \times 10^5$ ,  $5 \times 10^5$ ,  $1 \times 10^6$ , koncentrációjú spermiumok petesejtek fertilizációs értékeire kifejtett hatását megállapítható, hogy a kisebb spermium koncentráció alkalmazása a polispermia arányának csökkenéséhez vezet (49,9%; 58,2%; 81,8 %). Mivel az alacsony spermium koncentráció használata együtt járt a penetráció arányának csökkenésével is, ezért a további kísérletekben az  $5 \times 10^5$  spermakonzentráció alkalmazása volt megfelelő.

A 10% folliculus kiegészítés mellett vizsgáltam a petesejtek különböző (NCSU 23, TCM 199 Waymouth) médiumokban érlelésének hatását a fertilizációs paraméterek alakulására. Penetráció, valamint a polispermia viszonylatában  $P < 0,05$  szinten nincs szignifikáns különbség a maturáltatásra használt táptalajok között, azaz a citoplazmatikus érés feltételei egyaránt adottak mindhárom vizsgált táptalajnál. A hím pronucleus kialakulásának valószínűsége  $P < 0,05$  szinten szignifikánsan kisebb Waymouth (55,5%) táptalajon érlelésnél a kísérletben kapott eredmények alapján, mint az NCSU 23 (68,2%) és TCM 199 (66,3%) táptalajoknál.

Különböző kanok spermáját használva a fertilizációhoz kísérletek túlnyomó többségénél alkalmazott 1. kan spermával termékenyítve, a nagy penetráló képesség mellett (80,4%) aránylag nagy a hím pronucleus kialakulásának aránya (63,9%). A 2. kan penetráló képessége szignifikánsan kisebb (52,0%) a bejutó kevesebb spermiumból azonban az 1. kan termékenyítő anyagát használthoz közeli arányban alakultak ki a hím pronucleusok (70,4%). A harmadik kan penetráló képessége közel azonos az elsővel (76,2%), viszont ( $P < 0,05$  szinten) szignifikánsan több petesejt volt polispermikus (80,2%), mint az 1. (61,4%) és 2. (60,2%) kan spermájával termékenyítve, valamint a petesejtenkénti spermiumszám is sokkal magasabb (7,73) volt a 3. kannál. Az eredményekből látszik, hogy ebben a rendszerben vizsgálva különbség adódott a különböző kanok spermiumai között, de annak igazolása, hogy ez milyen mértékben függ össze az in vivo termékenyítőképességgel további kutatásokat igényel. A polispermia csökkentésére intracitoplazmás injektálási kísérleteket is tervezünk, valamint a fertilizációs idő jelentős csökkentésének hatását is vizsgálni fogjuk.

A kísérleti eredmény szerint az in vitro fertilizációhoz a TCM 199 és mTBM közeg egyaránt alkalmazható. Szignifikáns különbség ( $P < 0,05$ ) csak a polispermia értékében adódott 56,3% az mTBM közeg alkalmazásakor, míg 76,2% a TCM 199 fertilizációs közegben. A penetrációban és a hím pronucleusok kialakulásában nem volt szignifikáns különbség.

Oviduct monolayeren (egyrétegű sejtenyészet) végzett fertilizációt kontrollal összevetve megállapítható, hogy a spermiumok penetrációs képessége nőtt (90,9%, illetve 82,3%) a polispermia szignifikánsan csökkent  $P < 0,05$  szinten (52,7%, illetve 67,0%). A kokultiválás nem befolyásolta a hím pronucleusok kialakulásának arányát (73,8%, illetve 71,0%),

Missouri-Columbia Egyetemen bekapcsolódva a laboratóriumban folyó munkákba a maturációs közeg különböző koncentrációjú (0, 10, 20, 30 ng/ml) EGF kiegészítését valósítottam meg, és ennek hatását vizsgáltam a sertés zigóták fejlődésére. A kontrollhoz (37,5%) viszonyítva, mind a morulák kialakulásának aránya (53,9; 56,7; 45,4%), mind a blastocysták aránya (15,5; 19,5; 12,3%) lényegesen magasabb volt, mint a kontroll értéke (3,0%), amely  $P < 0,05$  szinten szignifikáns különbséget jelent. A különböző koncentrációjú EGF hozzáadása az in vitro maturáció alatt az eredmények alapján elősegítette a petesejtek érését és az embriók fejlődését.

Az eddig még nem vizsgált NGF növekedési faktor petesejt maturációra és ezzel összefüggésben a zigóták fejlődésére kifejtett hatásának vizsgálatát is megkezdtem. Mind a fejlődő morulák számában (kontroll: 37,3%; 1 ng/ml: 47,2%; 5 ng/ml: 41,2%; 10 ng/ml: 31,1%), mind a blastocysták arányában (kontroll: 3,0% ; 1 ng/ml: 11,2%; 5 ng/ml: 6,3%; 10ng/ml: 4,1%) a kontrollal összehasonlítva az alkalmazott NGF koncentrációk előmozdították a petesejt érését és ennek következtében az embriófejlődés hatékonyságát, a különbségek azonban nem szignifikánsak

További feladataink, hogy jobban megértsük a különböző növekedési faktoroknak a meiózis újraindításában játszott szerepét, különös tekintettel az NGF szerepének tisztázására. Ha az idegi növekedési faktor szerepe igazolható a maturációs folyamatokban, ez a tény újabb bizonyítéka lesz a neurohumorális rendszer szoros kapcsolatának, és az életfolyamatok irányításában betöltött szerepének.

## SUMMARY

### *Introduction*

There is a revolution of biotechnology in animal breeding nowadays. The results of comparative genome mapping improved the importance of pig in vitro embryo manipulation. There are a lot of trials to create transgenic pig for xeno-transplantation or human diseases models all over the world.

With the maturation of pig in vitro oocytes we can get morphologically apparently mature oocytes, but in consequence of the insufficient nucleus and cytoplasmic maturation the fertilization efficiency is low, the polyspermic oocytes rate is very high and the development of embryos is insufficient. It is justified, that different agents accumulate in the follicular fluid, which are produced by somatic follicular cells and they influence the maturation of oocytes. One of the most exciting fields of research nowadays is examining the effects of different growth factors.

### *Aim*

To create a new pig in vitro maturation fertilization system, and to improve the knowledge about meiosis resumption.

### *Material and methods*

The Cumulus-Oocyte-Complexes (COC) were gathered from slaughterhouse ovaries, after microscopic evaluation and selection they were matured in different maturation mediums (TCM 199, NCSU 23, Waymouth). The NCSU 23 medium was supplemented with 1% essential amino acid; and the and NCSU 23 TCM 199 mediums were supplemented with 0.1 mg/ml cystein. The effects of the supplementation of 10 % follicular fluid TCM 199 were examined in case of each

mediums. The cocultivation with Follicular Shell Pieces (FSP) of TCM 199 medium also was examined. The mediums contain 10 IU HCG and 10 IU PMSG for help the maturation.

After maturation the cumulus cells were removed with 1% hyaluronidase in TCM 199. Cumulus free oocytes were coincubated with frozen-thawed spermatozoa in modified Tris-buffered (mTBM) or TCM 199 1mM caffeine and 0.1% BSA or calcium-lactate supplementation. The effect of Porcine Oviduct Epithelial Cells (POEC) coincubation in TCM 199 on fertilization was examined also.

12 hr after the IVM culture (nuclear maturation and fertilization) oocytes were mounted, fixed for 48-72 hr in 25% (v/v) acetic acid in ethanol at room temperature, and IVF fertilization parameters were evaluated. The oocytes were stained with 1% (v/v) orcein in 45% acetic acid (v/v) and examined under invert microscope at 200x and 400x magnification. Oocytes were considered to be penetrated (PEN) when they had one or more [polispermic (POL)] swollen sperm head(s) and/or male pronuclei with their corresponding sperm tails. The average number of spermium/oocyte = S/O what penetrated into oocytes and the rate of male pronucleus (MPN) were defined.

Experiments were repeated three times. Data (mean  $\pm$  SEM) were pooled and analysed by Excel program. ANOVA/ NANOVA part of Statistica program was applied for the one way variance analysis.

### *Results, conclusions and further tasks*

The rate of oocytes reaching the MII. stage of meiosis is an adequate parameter for assessing nuclear maturation. In case of follicular fluid supplementation 90% of the oocytes reached the MII: stage in each examined maturation mediums, it was verified by orcein staining of matured oocytes. 52.0% (NCSU23), 57.0% (Waymount) and 59.8% (TCM 199) of the oocytes reached the

MII. stage without follicular fluid supplementation, and 30% of the oocytes remain in GV stage in NCSU 23 medium

The effects of  $2,5 \times 10^5$ ,  $5 \times 10^5$ ,  $1 \times 10^6$  sperm concentrations were examined to in vitro fertilization parameters. The polyspermic rate was lower at lower sperm concentration (49.9, 58.2 81.8%), but the low sperm concentration caused low penetration rate, so the middle sperm concentration ( $5 \times 10^5$ ) was chosen for fertilization examinations.

The influence of applying of 10% follicular-fluid supplementation of different maturation mediums to in vitro fertilization parameters was examined. The rate of male pronucleus was significantly ( $P < 0.05$ ) lower in Waymouth medium (55.5%), than in NCSU 23 (68.2%) or TCM 199 medium (66.3%) and there was no significant difference between penetration and polyspermic rate, consequently the condition of cytoplasmic maturation are the same all of the three mediums.

The results of fertilization with semen of different boars show that the penetration rate (80.4%) and formation of male pronucleus (63.9%) were relatively high using the 1<sup>st</sup> boar's semen. The penetration rate was significantly ( $P < 0.05$ ) lower (52.0%) at the 2<sup>nd</sup> boar, but the rate of male pronucleus formation (70.4%) was nearly similar to the first boar. The penetration rate of the 3<sup>rd</sup> boar (76.2%) was nearly similar to the 1<sup>st</sup> one, but the polyspermic rate was significantly ( $P < 0.05$ ) higher at the 3<sup>rd</sup> boar (80.2%) than at the 1<sup>st</sup> (61.4%) or at the 2<sup>nd</sup> (60.2%). The mean number of spermatozoa per oocyte was much more higher (7.7) using the 3<sup>rd</sup> boar. There were differences between the effects on the fertilization parameters during the examination of the tree boars, but to justify the correlation of the in vitro and in vivo fertility results, some more experiments should be done. Intracytoplasmic injections experiments will be done to decrease the polyspermic rate. Further on there will be examinations concerning the effects of significant decrease in the fertilization time-period.

According to the results of experiments both TCM 199 and mTBM mediums can be used to in vitro fertilization. There was significant difference only polyspermic rate when apply TCM 199 (76.2%). No differences were observed between penetration, polyspermic rate and male pronucleus formation at using mTBM and TCM 199 for in vitro fertilization mediums.

Comparing control and oocyte cultured with Porcine Oviduct Epithelial Cells (POEC)= oviduct monolayer under maturation the results show higher penetration rate (82.3 vs 90.9%) and significantly ( $P < 0.05$ ) reduced polyspermic rate (67.0 vs 52.7%). The cocultivation did not influence the male pronucleus formation (71,0 vs 73.8%).

Participating in the research at University of Missouri Columbia I examined the effects of maturation medium supplementation with different concentrations (10, 20, 30 ng/ml) of EGF to pig embryo development. The rate of formation of morulas was higher (53.9, 56.7, 45.4%) than in the control (35.5%) and the rate of blastocysts (5.5, 19.5 12.3% ) were also significantly ( $P < 0.05$ ) higher than in the control (3.0%). Adding the different concentrations of EGF during IVM enhanced the maturation of oocytes and subsequent embryo development.

Our group was the first who examined the effects of maturation medium supplementation with different concentrations (1, 5, 10 ng/ml) of NGF to pig embryo development. The rate of formation of morulas were control: 37.3%; 1 ng/ml: 47.23%; 5 ng/ml: 41.2%; 10 ng/ml: 31.1% . The rate of blastocysts developing were: control: 3,0% ; 1 ng/ml: 11.2%; 5 ng/ml: 6.3%; 10 ng/ml: 4,1%. The results show that some NGF (1, 5 ng/ml) concentrations during maturation enhanced the oocyte maturation and embryo development, but the differences were not significant.

Our aim is to improve understanding the processes of oocyte meiosis resumption. It is possible that the different growth factors play important roles in the regulation of these processes. Participation of the NGF in the ovulatory process

appears to provide a unique example for the neuroendocrine integration and to its role in controlling living processes.



## IRODALOMJEGYZÉK

1. **Abeydeera L.R. – Funahashi H. – Day B.N. (1996)** Penetration of in vitro matured pig oocytes by frozen thawed ejaculated boar sperm in a modified Tris-buffered medium and their subsequent development. *J. Anim. Sci. Suppl.* 1 74-47.
2. **Abeydeera L.R. – Wang W.H. – Cantley T.C. – Rieke A. – Day B.N. (1998.)** Coculture with follicular shell pieces can enhance the development competence of pig oocytes after in vitro fertilization: relevance to intracellular glutathione. *Biol. Reprod.* 58 213-218.
3. **Abeydeera L.R. – Wang W.H. – Prather R.S. – Day B.N. (1998)** Maturation in vitro of pig oocytes in protein-free culture media: fertilization and subsequent embryo development in vitro. *Biol. Reprod.* 58 1316-1320.
4. **Abeydeera L.R. – Wang W.H. – Cantley T. – Rieke A. – Prather R. – Day, B. (1998)** Presence of epidermal growth factor during in vitro maturation of pig oocytes and embryo culture can modulate blastocyst development after in vitro fertilization. *Mol. Reprod. Dev.* 51 395-401.
5. **Adenot P.G. – Szöllösi M.S. – Geze M. – Renard J.P. – Debey P. (1991)** Dynamics of paternal chromatin changes in live one-cell mouse embryos after natural fertilization. *Mol. Reprod. Dev.* 28 23-34.
6. **Aitken R.J. (1981)** Aspects of delayed implantation in the roe deer (*Capreolus, capreolus*) (1981) *J. Reprod. Fert. Suppl* 29 83-95.
7. **Asworth P.J.C. – Harrison R.A.P. – Miller N.G.A. – Plummer J.M. – Watson P.F. (1995)** Flow cytometric detection of bicarbonate-induced changes in lectin binding in boar and ram spermatozoa populations. *Mol. Reprod. Fertil.* 101 167-173.
8. **Austin C.R. (1951)** The „capacitation” of the mammalian sperm. *Nature London* 170 326-330
9. **Barboni B. – Mattioli M. – Seren E. (1995)** Influence of progesterone on boar sperm capacitation. *J. Endocrin.* 144 13-18.

10. **Bavister B.D. (1987)** Studies of development block in cultured hamster embryos. In: Bavister B.D. (ed.) The mammalian preimplantation embryo. Plenum Press, New York 219-249.
11. **Becze J. (1981)** A nőivarú állatok szaporodásbiológiája. Mezőgazdasági Kiadó, Budapest.
12. **Becze J. - Koppány Á. - Kővári L. - Papp D. - Wekerle L. (1986)** Első malacok embrióátültetésből Magyarországon. Magyar Áo. Lapja 41 332-334.
13. **Beckmann L.S. – Day B.N. (1993)** Effect of media NaCl concentration and osmolarity on culture of the early stage porcine embryo and viability of embryos cultured in a selected superior medium. Therio. 39 611-622.
14. **Bedford J.M. (1983)** Significance of the need for sperm capacitation before fertilization in eutherian mammals. Biol. Reprod. 28 108-120.
15. **Betteridge K.J. – Eaglesome M.D. – Randall G.C.B. – Mitchell D. (1980)** Collection, description and transfer of embryos from cattle 10-16 days after oestrus. J. Reprod. Fert. 59 205-216.
16. **Boland M. (1984)** Use of the rabbit oviduct as a screening tool for the viability of mammalian eggs. Therio. 21 126-137.
17. **Bracket A. (1913)** Recherches sur le determinisme hereditaire de l'oeuf des mammiferes. Developement in vitro de jeunes vesicules blastodermiques du lapin. Arch. Biol. Paris. 28 447-504.
18. **Brinster R.L. (1963)** A method for in vitro cultivation of mouse ova from two-cell blastocyst. Exp. Cell. Res. 32 205-208.
19. **Carney E.W. - Bavister B.D. (1986)** Increased atmospheric carbon dioxide stimulates hamster embryo development in vitro. Biol. Reprod. 34 Suppl.1. 199.
20. **Carpenter G. - Cohen S. (1979)** Effects of EGF on proliferation of epithelial cells Ann. rev. biochem. 48 193.

21. **Chapman K.G. - Alegnani W.C. (1983)** Protection of water treatment systems. Part 1. Pharm. Technol. 7 48-57
22. **Cheng W.T.K. - Moor R.M. - Polge C. (1986)** In vitro fertilization of pig and sheep oocytes matured in vivo and in vitro. Therio. 25 146.
23. **Christmann L. - Jung T. - Moor R.M. (1994)** MPF components and meiotic competence in growing pig oocytes. Mol. Reprod. Dev. 38 85-90.
24. **Cohen S.J. (1962)** A new compound from mouse maxillary gland. Biol. Chem. 237 1555.
25. **Coskun S. - Lin Y.C. (1994)** Effects of transforming growth factors and activin-A on in vitro porcine maturation. Mol. Reprod. Dev. 38 153-158.
26. **Coy P. - Martinez E. - Ruiz S. - Vázquez J.M. - Roca J. - Matas C. (1993)** Sperm concentration influences fertilization and male pronuclear formation. Therio. 39 1201.
27. **Dandekar P. - Talbot P. (1994)** Perivitelline space of mammalian oocytes: extracellular matrix of unfertilised oocytes and formation of a cortical granule envelope following fertilization. Mol. Reprod. Dev. (1992.) 31 135-143.
28. **Day B.N. - Funahashi H. (1996)** In vitro maturation and fertilization of pig oocytes. In: Miller, R.H.- Pursel, V.G.- Normal, H.D. (eds.) Beltsville Symposia in Agricultural Research II. Biotechnology's Role in the Genetic Improvement of Farm Animals Savoy, IL: American Society of Animal Science. 125-144.
29. **Davis D. (1985)** Culture and stage of pig embryos. J. Reprod. Fertil. Suppl. 38 115-124.
30. **De Mott R.P. - Suarez S.S. (1992)** Hyperactivated sperm progress in the mouse oviduct. Biol. Reprod. 46 779-785.
31. **Ding J. - Foxcroft G.R. (1992)** Follicular heterogeneity and oocyte maturation in vitro in pigs. Biol. Reprod. 47 648.

32. **Ding J. - Foxcroft G.R. (1994.)** Epidermal growth factor enhances oocyte in pigs maturation. *Mol. Reprod. Dev.* 39 30-40.
33. **Ding J. - Foxcroft G.R. (1994)** FSH-stimulated follicular secretions enhanced oocyte maturation in pigs. *Therio.* 41 1437.
34. **Dissen G.A. - Hill D.F. - Costa M.E. - Dees W.I. - Lara H.E. - Ojeda S.R. (1996)** A role for trkA nerve growth factor receptors in mammalian ovulation. *Endoc.* 137 198-209.
35. **Dohy J. (1999)** Genetika Állattenyésztőknek. Mezőgazda kiadó, Budapest
36. **Ducibella T. (1998)** Biochemical and cellular insights into the temporal window of normal fertilization. *Therio* 49 53-65
37. **Edge A.S. – Gosse M.E. – Dinsmore I. (1998)** Xenogeneic cell therapy. Current progress and future developments in porcine cell transplantation. *Cell. Transp.* 7 (6) 523-539.
38. **Ehrhard P.B. - Erb P. - Graumann U. - Otten V. (1993)** Expression of nerve growth factor and nerve growth factor receptor tyrosine kinase trk in activated CD4-positive T-cell clones. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90 10984-10988.
39. **Fancsovits P.- Dinnyés A.- Dohy J. (1998)** Emlősembriók in vitro kultivációja. *Magyar Áo.Lapja* 3 152-158.
40. **Flood M.R. - Gage T.L. - Bunch T.D. (1993)** Effect of various growth promoting factors on preimplantation bovine embryo development in vitro. *Therio.* 39 823-833.
41. **Ford S.P. (1997)** Embryonic and fetal development in different genotypes in pigs. In: Foxcroft G.R. – Geisert R.D. – Dobresca C. (eds.) Control of pig reproduction V. *J. Reprod. Fertil. Ltd.* 165- 176.
42. **Ford S.P. – Youngs C.R. (1993)** Early embryonic development in prolific Meishan pigs. *J. Anim. Sci.* 48 271-278

43. **Fujinaga H. - Yamoto M. - Nahano R. - Skiora K. (1992)** Epidermal growth factor binding site in porcine granulosa cells and their regulation by follicle-stimulating hormone. *Biol. Reprod* 46 705-709.
44. **Funahashi H. - Day B.N. (1993)** Effects of the duration of exposure to supplemental hormones on cytoplasmic maturation on pig oocytes in vitro. *J. Reprod. Fertil.* 98 179.
45. **Funahashi H. - Day B.N. (1993)** Effects of different serum supplements in maturation medium on meiotic and cytoplasmic maturation of pig oocytes. *Therio.* 39 965.
46. **Funahashi H. - Day B.N. (1993)** Effects of follicular fluid at fertilization in vitro on sperm penetration in pig oocytes. *J. Reprod. Fertil.* 99 97-103.
47. **Funahashi H. - Cantley T.C. – Stumpf T.T. - Terlouw S.L. - Day B.N. (1994)** Use of low salt culture medium for in vitro maturation of porcine oocytes is associated with elevated oocyte glutathione levels and enhanced male pronuclear formation after in vitro fertilization. *Biol. Reprod.* 51 633-639.
48. **Funahashi H. - Day B. N. (1995)** Effect of exposure of porcine oocyte-cumulus complexes to gonadotropins. Presented at Beltsville Symposia in Agricultural Research XX: Biotechnology's Role in the Genetic Improvement of Farm Animals, Beltsville, (MD) (Abstr.)
49. **Funahashi H. - Day B.N. (1995)** Effect of cumulus cells on glutathione content of porcine oocyte during in vitro maturation *J. Anim Sci.* 73 Suppl.1.90.(Abstr.)
50. **Funahashi H. - Macháty Z. - Prather R.S. - Day B.N. (1995)**  $\gamma$ -Glutamyl-transpeptidase (GGT) of spermatozoa may reduce oocyte glutathione (GSH) content at sperm penetration. *Biol. Reprod. Suppl.1.* 52 140. (Abstr.)
51. **Funahashi H. - Day B.N. (1997)** Advances in in vitro production of pig embryos *J. Reprod. Fertil Suppl.* 52 271-283.

52. **Galvin J.M. - Stewart A.N.V.- Meredith S. (1993)** Higher sodium chloride concentration can induce a four-cell block in porcine embryos. *Therio.* 39 224.
53. **Gandolfi F. - Moor R.M. (1987)** Stimulation of early embryonic development in the sheep by co-culture with oviduct epithelial cells. *J. Reprod. Fertil.* 81 23.
54. **Gandolfi F. - Moor R.M. (1988)** Interactions between somatic and germinal cells during early development. In.: Congress Proceedings, 11<sup>th</sup> International Congress on Animal Reproduction and Artificial Insemination. 170-177.
55. **Gioia L. (1996)** Control of ovarian innervation. *Zygote.* 4 295-298.
56. **Geisert R.D. - Brookbank J.W. - Roberts R.M. - Bazer F.W. (1982)** Establishment of pregnancy in the pig: II. cellular remodelling of the porcine blastocyst during elongation on day 12 of pregnancy. *Biol. Reprod.* 27 941-955.
57. **Go K.J. - Wolf D.P. (1985)** Albumin-mediated changes in sperm sterol content during capacitation. *J. Reprod. Fertil.* 32 145-153.
58. **Goodall H. - Johnson M. H. (1984)** The nature of intracellular coupling within the preinplantation mouse embryo. *J. Embr. Exp. Morph.* 79 53-76.
59. **Gosden R.G. - Telfer E. (1987)** Number of follicles and oocytes in mammalian ovaries and their allometric relationships. *J. Zool., London* 211 169-175.
60. **Grant S.A. - Hunter M.G. - Foxcroft G.R. (1989)** Morphological and biochemical characteristics during ovarian follicular development in the pig. *J. Reprod. Fertil.* 86 171.
61. **Grupen C.G. - Nagashima H. - Nottle M.B. (1995)** Cysteamine enhances in vitro development of IVM-IVF porcine oocytes. *Therio.* 43 227 (Abstr.)
62. **Gulyas B. (1980)** Cortical granules of mammalian eggs. *Int. Rev.Cytol.* 63 357-392.

63. **Harrison R.A.P. - Ashworth P.J.C. - Miller N.G.A. (1996)** Bicarbonate/CO<sub>2</sub>, an effector of capacitation, induces a rapid and reversible changes in the lipid architecture of boar sperm plasma membranes. *Mol. Reprod. Dev.* 45 378-391.
64. **Harrison R.A.P. (1997)** Sperm plasma membrane characteristics and boar semen fertility. *J. Reprod. Fert. Suppl.* 52 195-211.
65. **Heyman Y. - Camous S. - Fevre J. - Meziou W. - Martal J. (1984)** Maintenance of the corpus luteum after uterine transfer of trophoblastic vesicles to cyclic cows and sheep. *J. Reprod. Fertil.* 70 533-540.
66. **Hirao Y. - Nagai T. - Kubo M. - Miyano T. - Miyake M. - Kato S. (1994)** In vitro growth and maturation of pig oocytes. *J. Reprod. Fertil.* 100 333-339.
67. **Horigome K. - Pryor J.C. - Bullock E.D. - Johnson Jr. E.M. (1993)** Mediator release from mass cells by nerve growth factor. *J. Biol. Chem.* 268 14881-14887.
68. **Houseknecht K.L. – Baile C.A. – Matteri R.L. – Spurlock M.E. (1998)** The biology of leptin: a review. *J. Anim. Sci.* 76 1405-1420.
69. **Hunter M.G.- Wiesak T. (1990)** Evidence for and implications of follicular heterogeneity in pigs. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 40 163.
70. **Hunter R.H.F (1990)** Ovarian endocrine control of sperm progression in the Fallopian tubes. *Oxford Rev. Reprod. Biol.* (1995.) 17 85-92.
71. **Hunter R.H.F. (1996)** Ovarian control of very low sperm: egg ratios at the commencement of mammalian fertilization to avoid polyspermy. *Mol. Reprod. Dev.* 44 417-422.
72. **Hunter R.H.F. (1998)** Sperm-epithelial interactions in the isthmus and ampulla of the Fallopian tubes and their ovarian control. In: Lauria A.-Gandolfi F.- Enne, G.- Gianoroli L. (eds.) *Gametes: Development and Function*. Serono Symposia. Milano. 355-371.

73. **Hunter R.H.F. - Polge C. (1966)** Maturation of follicular oocytes in the pig after injection of human chorionic gonadotrophin. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 12 525-531.
74. **Hunter R.H.F. - Cook B. - Poyser N.L. (1983)** Regulation of oviduct function in pigs by local transfer of ovarian steroids and prostaglandin's: a mechanism to influence sperm transport: *Europ. J. Obst. Gynaec. Reprod. Biol.* 14 225-232.
75. **Hunter R.H.F.- Wilmut I. (1984)** Sperm transport in the cow: periovulatory redistribution of viable cells within the oviduct. *Reprod. Nutr. Devel.* 24 597-608.
76. **Hunter R.H.F. - Nichol R. (1988)** Capacitacion potencial of the Fallopian tube: a study involving surgical insemination and subsequent incidence of polyspermy. *Gam. Res.* 21 255-266.
77. **Iritani A. - Niwa K. - Imai H. (1978)** Sperm penetration of pig follicular oocytes matured in culture. *J. Reprod. Fertil.* 54 379-383.
78. **Jones R. (1991)** Interaction of zona pellucida glycoproteins, sulphated carbohydrates and synthetic polymers with proacrosin, the putative egg-binding protein from mammalian spermatozoa. *Dev.* 111 1155-1163.
79. **Kane M.T. (1986)** Culture media and culture of early embryos. *Therio.* 27 47-57.
80. **Kaplan D.R. - Hempstead B.L. - Martin-Zanca D. - Chao M.V. - Parada L.F. (1991)** The trk proto-oncogene product: a signal transducing receptor for nerve growth factor. *Sci.* 252 554-558.
81. **Karp G. (1999)** Cell and molecular biology. John Wiley & Sons, Inc. New York /[http://www. Isus. Edu/sc/bios/karp.htm/](http://www.Isus.Edu/sc/bios/karp.htm/)



82. **Kaye P.L. - Bell, K.L. – Beebe L.F. – Dunlison L.F.S. - Gardner H.G. - Harvey M.B. (1992)** Insulin-like growth factors (IGFs) in preinplantation development. *Reprod. Fertil. Dev.* 4 373-386.
83. **Kikuchi K. - Naito K. - Daen F.P. - Izaike Y. - Toyoda Y. (1995)** Histone H<sub>1</sub> kinase activity during in vitro fertilization of pig follicular oocytes matured in vitro. *Therio.* 43 248.
84. **Kim J.J. - Fazleabas T. (1999)** Growth factors. In: Knobil, E.- Neill, J.D. (eds.) *Encyclopedia of Reproduction.* Vol. 2. Academic Press, San Diego. 573-583.
85. **Kim N.H. - Menino A. R. J. (1995)** Effects of stimulators of protein kinase A and C and modulators of phosphorylation on plasminogen activator activity in porcine oocyte-cumulus complexes during in vitro maturation. *Mol. Reprod. Dev.* 40 364.
86. **King W. A. - Niar A. - Chartrain I. - Betteridge K.J. - Guay P. (1988)** Nucleolus organiser regions and nucleolus in preattachment bovine embryos. *J. Reprod. Fertil.* 82 87-95.
87. **Koppány Á- Wekerle L.- Sebestyén J. (1988)** In vitro termékenyítési kísérletek sertésben. *MÁL.* 43 75-78.
88. **Kovács A. - Foote R.H. (1992)** Viability and acrosome staining of bull, boar, and rabbit spermatozoa. *Biotech. and Histochem.* 67 119-124.
89. **Lambright D. - Sach D.H. - Cooper, D.K.C. (1998)** Discordant xenotransplantation in primates. *Transp.* 66 547-561
90. **Laurincik J. - Rath D. - Niemann H. (1994)** Differences in pronucleus formation and first cleavage following in vitro fertilization between pig oocytes matured in vivo and in vitro. *J. Reprod. Fertil.* 102 277.
91. **Levi-Montalcini R. (1987)** Identification of nerve growth factor. *Sci.* 237 1154.

92. **Lewis W. H. - Gregory P.W. (1929)** Cinematographs of living developing rabbit eggs. *Sci.* 69 226-229.
93. **Lorenzo P.L. - Rebollar P.G. - Illera J.C. - Illera M. - Alvarino M.R. (1996)** Stimulatory effect of insulin-like growth factor I. and epidermal growth factor on the maturation of rabbit oocytes in vitro. *J. Reprod Fert.* 107 109-117.
94. **Martinez E. - Vazquez J.M. - Matas C. - Roca J. - Coy P. - Gadea J. (1993)** Evaluation of boar spermatozoa penetrating capacity using pig oocytes at the germinal vesicle stage. *Therio.* 40 547.
95. **Martin-Zanca D. - Barbacid M. - Parada L.F. (1990)** Expression of the *trk* proto-oncogene is restricted to the sensory cranial and spinal ganglia of neural crest origin in mouse development. *Genes Dev.* 4 683-694.
96. **Mattioli M. - Galeati G. - Bacci M.L. - Seren E. (1988)** Follicular factors influence oocyte fertilisability by modulating the intercellular cooperacy between cumulus cells and oocyte. *Gam. Res.* 21 223-232.
97. **Mattioli M. - Bacci M.L. - Galeati G. - Seren E. (1989)** Developmental competence of pig oocytes matured and fertilized in vitro. *Therio.* 31 1201-1207.
98. **Mattioli M. - Bacci M.L. - Galeati G. - Seren E (1991)** Effects of LH and FSH on the maturation of pig oocytes in vitro. *Therio.* 36 95.
99. **Mattioli M. - Galeati G. - Barboni B. - Seren E (1994)** Concentration of cyclic AMP during the maturation of pig oocytes in vivo and in vitro. *J. Reprod. Fertil.* 100 403.
100. **Mattioli M. - Barboni B.C.- Lucidi P. - Seren E. (1996)** Identification of capacitation in boar spermatozoa by chlortetracycline staining. *Therio.* 45 373-381.
101. **Mayerhofer A. - Dissen G.A. - Parrot J.A. - Hill D.F. - Mayerhofer D.- Garfield R.E. - Costa M.E. - Skinner M.K. - Ojeda S.R. (1996)** Involvement

- of nerve growth factor in the quality cascade: trkA receptor activation inhibits gap junctional communication between theca cells *Endoc* 137 5662-5669.
102. **Missale C. - Boroni F. - Sigala S. - Zanellato A. - Dal Toso M. - Balsari A. - Spano P. (1994)** Nerve growth factor directs differentiation of the bipotential cell line H6-3 in to the mammoth phenotype. *Endoc.* 135 290-298.
103. **Monk M (1987)** Memories of mother and father. *Nat.* 328 203-204.
104. **Moore N.W. (1975)** The control of time of oestrus and ovulation and the induction of superovulation in cattle. *Aust. J. Agric Res.* 26 295-304.
105. **Morcol T. - Akers R.M. - Johnson J.L. (1994)** The porcine mammary gland as a bioreactor for complex proteins. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 721 218.
106. **Motlik J. - Fulka J. (1974)** Fertilization of pig follicular oocytes cultivated in vitro. *J. Reprod. Fertil.* 36 235-237.
107. **Nagai T. - Niwa K. - Iritani A. (1984)** Effect of sperm concentration during preincubation in a defined medium on fertilization in vitro of pig follicular oocytes. *J. Reprod. Fertil.* 70 271-275.
108. **Nagai T. - Takahashi T. - Masuda Y. - Shiova Y. - Kuwayama M. - Fukushima M. - Iwasaki S. - Hanada A. (1988)** In vitro fertilization of pig oocytes by frozen boar spermatozoa. *J. Reprod. Fertil.* 84 585-591.
109. **Nagai T. - Moor R.M. (1990)** Effect of oviductal walls on the incidence of polyspermy in pig eggs fertilised in vitro. *Mol. Reprod. and Dev.* 26 377-382.
110. **Nagai T. (1994)** Current status and perspectives in IVM-IVF of porcine oocytes. *Therio.* 41 73.
111. **Nagai T. (1996)** In vitro maturation and fertilization of pig oocytes *Anim. Reprod. Sci.* 42 153-163.

112. **Naito K. - Fukuda Y. - Toyoda Y. (1988)** Effects of porcine follicular fluid on male pronucleus formation in porcine oocytes matured in vitro. *Gam. Res.* 21 289.
113. **Nancarrow C.D. - Wallace A.L.C. - Grewal A.S. (1981)** The early pregnancy factor of sheep and cattle. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 30 191-199.
114. **Ocampo M.B. - Ocampo L.C. - Ryu I.S. - Mori T. - Ueda J.- Kanagawa H. (1993)** Effects of culture time, ovarian activity, cumulus cells and sera on the nuclear and cytoplasmic maturation of pig oocytes in vitro. *Anim. Reprod. Sci.* 34 135.
115. **O'Neill C. (1997)** Evidence for the requirement of autocrine growth factors for development of mouse preimplantation embryos in vitro. *Biol. Reprod.* 56 229-237.
116. **Palma G.A. - Muller M. - Brem G. (1997)** Effect of insulin-like growth factor I (IGF-I) at high concentration on blastocyst development of bovine embryos produced in vitro. *J. Reprod. Fertil.* 110 347-353.
117. **Paria B.C. - Dey S.K. (1990)** Preimplantation embryo development in vitro: cooperative interactions among embryos and role of growth factors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 87 4756-4760.
118. **Parrish J.J. - Vredenburg W.L. - Larin C.A. (1993)** Increases in bovine sperm intracellular calcium (Ca) and pH (PHi) during capacitation. *Biol. Reprod.* 48 106.
119. **Perreault S.D. (1990)** Regulation of sperm nuclear reactivation during fertilization. In: Bavister B. D. - Cummins J. - Roldan E.R.S. (eds.) *Fertilization in Mammals*. Nowell Serono Symposia USA. 285-296.
120. **Petters R.M. - Reed M.L. (1991)** Addition of taurine or hypotaurine to culture medium improves development of one- and two -cell pig embryos. *Therio.* 35 (abstr.) 253.

121. **Petters R.M. - Wells K.D. (1993)** Culture of pig embryos. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 38 115-124.
122. **Picard L. - Greve T. - King W.A. - Betteridge K.J. - Holm Jörgensen P. (1986)** Bisection of post-compaction bovine embryos: the difference in viability between the two monozygotic halves. *Acta. Vet. Scand.* 27 33-48.
123. **Pincus G. (1930)** Observations on the living eggs of the rabbit. *Proc. Roy. Ser. B.* 107 132-167.
124. **Pivco J. - Kopecny V. - Tomanek M. - Kanka J. - Fléchon J.E. (1986)** Autoradiography of <sup>3</sup>H-uridine incorporation in the normal early blastocysts of cattle. *Reprod. Nutr. Dev.* 26 1009-1015.
125. **Pollard J.W - Plante C. - King W.A. - Hansen P.J. - Betteridge K.J. - Suarez S.S. (1992)** Fertilising capacity of bovine sperm may be maintained by binding to oviductal epithelial cells. *Biol. Reprod.* 46 729-733.
126. **Prather R.S. - First N.L. (1993)** Cell-to-cell coupling in early stage bovine embryos:a preliminary report. *Therio.* 41 387-402.
127. **Prather R.S. (1999)** Cloning mammals by nuclear transfer. In: Knobil E. – Neill J.D. (eds.) *Encyclopedia of Reproduction*. Vol 1. Academic Press, San Diego. 638-644.
128. **Pursel V.G. – Hammer R.E. - Bolt D.J. – Palmiter R.D. - Brinster R.L. (1990)** Integration, expression and germ line transmission of growth related genes in pigs. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 41 77-87.
129. **Racowsky C. - Mc Gaughey R.W. (1982)** In the absence of protein, estradiol supplemented meiosis of porcine oocytes in vitro. *J. Exp. Zool.* 224 103-110.
130. **Rath D. (1992)** Experiments to improve in vitro fertilization techniques for in vivo-matured porcine oocytes. *Therio.* 37 885-896.

131. **Rátky J. - Solti L. - Sarlós P. - Brussow K.P. - Torner H. (1998)** Effect of follicular fluid on porcine sperm cell transport in vitro. In: Lauria A. Gandolfi F. - Enne G. - Gianoroli L. (eds.) *Gametes: Development and Function* Serono Symposia. Milano. 592.
132. **Reed M.L. - Estrada J.L. - Illera M.J. - Petters R.M. (1993)** Effects of epidermal growth factor, insulin-like growth factor-I, and dialysed porcine follicular fluid on porcine oocyte maturation in vitro. *J. Exp. Zool.* 266 74.
133. **Rexroad C.E.Jr. – Powell A.M. (1988)** Coculture of ovine ova with oviductal cells and trophoblastic vesicles. *Therio.* 29 947-953.
134. **Robl J.M. - Prather R. - Barnes F. - Eyestone W. - Northey D. - Gilligan B. - First N.L. (1987)** Nuclear transplantation in bovine embryos. *J. Anim. Sci.* 64 642-647.
135. **Robl J. M. - Fissore R.A. (1999)** Gametes, overview. In: *Encyclopedia of Reproduction*. Vol. 2. Academic Press, San Diego. 430-434.
136. **Romagnolo D. – Di Augustine R.P. (1994)** Transgenic approaches for modifying the mammary gland to produce therapeutic proteins. *Env. Heath-Pers.* 102 10 846-851.
137. **Schuel H. (1985)** Functions of egg cortical granules. In: Metz, C., Monroy, A.(eds.) *Biology of Fertilization*. Academic Press, New York. Vol. 3. 1-44.
138. **Schroeter D. - Meinecke B. (1995)** Comparative analysis of the polypeptide pattern of cumulus cells during maturation of porcine cumulus oocyte complexes in vivo and in vitro. *Reprod. Nutr. Dev.* 35 85.
139. **Sharmann R. - Tazi A. - Polak M. - Kanaka C. - Czernichow P. (1993)** Expression of functional nerve growth factor receptors in pancreatic beta cell lines and foetal rat islets in primary culture. *Diab.* 42 1829-1836.

140. **Singh B. - Barbe G.J. - Armstrong D.T. (1993)** Factors influencing resumption of meiotic maturation and cumulus expansion of porcine oocyte-cumulus cell complexes in vitro. *Mol. Reprod. Dev.* 36 113.
141. **Sirard M.A. - Lambert R.D. (1985)** In vitro fertilization of bovine follicular oocytes obtained by laparoscopy. *Biol. Reprod.* 33 487-494.
142. **Sirotkin A.V. - Nyitray J. (1994)** Effects of prolactin on estrogen, cAMP and oxytocin secretion by porcine granulosa cells in vitro. *Reprod. Nutr. Dev.* 34 141.
143. **Smith R.K.W. - Johnson M.A. (1986)** Analysis of the third and fourth cell cycles of mouse early development. *J. Reprod. Fertil.* 76 393-399.
144. **Soede N.M - Helmond F.A. - Kemp B. (1994.)** Periovarian profiles of oestradiol, LH and progesterone in relation to oestrus and embryo mortality in multiparous sows using transrectal ultrasonography to detect ovulation. *J. Reprod. Fertil.* 101 633.
145. **Stoye J.P. - Le Tissier P. - Takeuchi Y. - Patience C. - Weiss R.A. (1998)** Endogenous retroviruses: a potential problem for xenotransplantation? *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 862 67-74.
146. **Strömstedt M. - Byskov A.G. (1999)** Oocyte, mammalian. In: Knobil, E.-Neill, J.M. (eds.) *Encyclopedia of Reproduction*. Vol. 3. Academic Press, San Diego. 469-480.
147. **Suarez S.S. - Redfern K. - Raynor P. - Martin F. - Phillips D.M. (1991)** Attachment of boar sperm to mucosal explants of oviduct in vitro: possible role in formation of a sperm reservoir. *Biol. Reprod.* 44 998-1004.
148. **Sun X. - Funk C.D. - Deng C. - Sahu A. - Lambris J.D. - Song W.C. (1999)** Role of decay accelerating factor in regulating complement activation on the erythrocyte surface as revealed by gene targeting. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 96 628-633.

149. **Suzuki K. - Ebihara M. - Nagai T. - Clarke N.G.E. - Harrison R.A.P. (1994)** Importance of bicarbonate/CO<sub>2</sub> for fertilization of pig oocytes in vitro, and synergism with caffeine. *Reprod. Fertil. Dev.* 6 221-227.
150. **Thompson T.C. - Troung L.D. - Timme T.L. - Kadmon D. - McCune B. K. - Flanders K.C. - Scardino P.T. - Park S.H. (1993)** Transgenic model for the study of prostata cancer. *Cancer Suppl.* 71 1165-1171.
151. **Tubiani D.R.P. - Yoshida T. - Komiya H. - Araki Y. (1997)** Mammalian fertilization: a carbohydrate-mediated event. *Biol. Reprod.* 57 487-494.
152. **Van Voorhis B.J. (1999)** Follicular development. In: Knobil E. - Neill J.D. (eds.) *Encyclopedia of Reproduction*. Vol. 2. Academic Press, San Diego. 376-389.
153. **Van Voorhis B.J. (1999)** Follicular steroidgenesis. In: Knobil E. - Neill J.D. (eds.) *Encyclopedia of Reproduction*. Vol. 2. Academic Press, San Diego. 389-395.
154. **Vitullo A.D. - Ozil J.P. (1992)** Repetitive calcium stimuli drive meiotic resumption and pronuclear development during mouse oocyte activation. *Dev. Biol.* 151 128-136.
155. **Wakefield M.J. - Gaves J.A.M. (1996)** Comparative maps of vertebrates. *Mam. Gen.* 7 715.
156. **Wang W.H. - Abeydeera L.R. - Okuda K. - Niwa K. (1994)** Penetration of porcine oocytes during maturation in vitro cryopreserved, ejaculated spermatozoa. *Biol. Reprod.* 50 510.
157. **Wang W.H. - Abeydeera L.R. - Fraser L.R. - Niwa K. (1995)** Functional analysis using chlortetracycline flurescence and in vitro fertilization of frozen thawed ejaculated boar spermatozoa incubated in a protein-free chemically defined medium. *J. Reprod. Fertil.* 104. 305-313.



158. **Wassarman P. - Josefowicz W. (1978)** Oocyte development in the mouse: An ultrastructural comparison of oocytes isolated at the various stages of growth and meiotic competence. *J. Morphol.* 156 209-235
159. **Whitten W.K. (1971)** Nutritional requirements for the culture of preimplantation embryos in vitro. *Adv. Biosci.* 6 129-139.
160. **Williams T.J. (1986)** A technique for sexing mouse embryos by a visual colorimetric assay of the X-linked enzyme, glucose 6-phosphate dehydrogenase. *Therio.* 25 733-739.
161. **Wolf P. - Meyer C. - Boudjema K. - Kieny R. - Cinqualbre J. - Jaeck D. - Andre E. - Herrenschmidt N. - Azimzade, A. (1997)** The pig as a model in liver xenotransplantation. *J. Heart Lung Transp. Vet. Res.* 28 (3) 217-222.
162. **Wood S.A. - Kaye P.L. (1989)** Effects of epidermal growth factor on preimplantation mouse embryos. *J. Reprod. Fertil.* 85 575-582.
163. **Xia P. - Tekpetey F.R. - Armstrong D.T. (1994)** Effect of IGF-I. on pig oocyte maturation, fertilization, and early development in vitro, and on granulosa and cumulus cells biosynthetic activity. *Mol. Reprod. Dev.* 38 373.
164. **Xu X. – Seth P.C. – Harbison D.S. – Cheung A.P. – Foxcroft G.R. (1996)** Semen dilution for assessment of boar ejaculate quality in pig IVM and IVF system. *Therio.* 46. 1325-1337
165. **Yao H.H.C. – Bahr J.M. (1999)** Ovary, overview. In: Knobil E. - Neill J.D. (eds.) *Encyclopedia of Reproduction Vol. 3.* Academic Press, San Diego. 590-597
166. **Yanagimachi R. (1994)** Mammalian fertilization. In: Knobil A - Neill J.D. (eds.) *The Physiology of Reproduction.* Raven Press, New York. 189-317.
167. **Ying S.Y. - Zhang Z. (1999)** Ovarian hormones, overview. In: Knobil E. -Neill J.D. (eds.) *Encyclopedia of Reproduction Vol. 3.* Academic Press, San Diego. 578-582.

168. **Yoshida M. - Ishigaki K. - Pursel V.G. (1992)** Effect of maturation media on male pronucleus formation in pig oocytes matured in vitro Mol. Reprod. Dev. 31 68.
169. **Yoshida M. (1993)** Role of glutathione in the maturation and fertilization of pig oocytes in vitro. Mol. Reprod. Dev. 35 76.
170. **Yoshida M. - Ishigaki K. - Nagai T. - Chikyu M - Pursel V.G. (1993)** Glutathione concentration during maturation and after fertilisation in pig oocytes: Relevance to the ability of oocytes to form male pronucleus. Biol. Reprod. 49 89.
171. **Zheng Y. S. - Sirard M. A. (1992)** The effect of sera, bovine serum albumin and follicular cells on in vitro maturation and fertilization of porcine oocytes. Therio. 37 779-790.

## **KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS**

Ezúton szeretnék köszönetet mondani IVÁNCSICS JÁNOS professzor úrnak, program- és témavezetőmnek, DOHY JÁNOS akadémikus úrnak, opponensimnek RÁTKY JÓZSEF tudományos igazgató úrnak és KOVÁCS ANDRÁS szaporodásbiológus osztályvezető úrnak, valamint az ÁLLATTENYÉSZTÉSI INTÉZET kollektívájának munkámhoz nyújtott értékes segítségükért.