

JUH EMBRIÓÁTÜLTETÉS AKTUÁLIS KÉRDÉSEI ÉS LEHETŐSÉGEI

CSEH SÁNDOR - VASS NÓRA - BRYDL ENDRE - JURKOVICS VIKTOR - SOLTI LÁSZLÓ -
FAIGL VERA

ÖSSZEFOGLALÁS

Az embrióátültetés (EÁ) komplex reprodukciós eljárás, ami több asszisztált reprodukciós technikát/technológiát (ART) foglal magában, mint pl. szuperovuláció, mesterséges termékenyítés (MT), embriókinyerés, in vitro termékenyítés, ivarsejt- és embriómélyhűtés, in vitro tenyésztés, embrió beültetés, ivarzás-szinkronizálás- és indukció, stb.. Az EÁ az 1970-es évek végétől hihetetlenül gyorsan fejlődött, ami elsősorban annak volt köszönhető, hogy a tenyésztők hamar felismerték, hogy a módszer a gyakorlati állattenyésztést nagyban segíti, és alkalmazása számos előnnyel jár. A szerzők áttekintik a gyakorlati juh EÁ hazai történetét és jelenét, valamint a benne rejlő lehetőségeket. A juh EÁ Magyarországon több mint 30 éves múltra tekint vissza és a 80-as években lényegesen nagyobb számban végezték, mint az elmúlt évtizedekben, illetve napjainkban.

SUMMARY

Cseh, S. - Vass, N. - Brydl, E. - Jurkovics, V. - Solti, L. - Faigl, V: ACTUAL QUESTIONS AND OPPORTUNITIES OF EMBRYOTRANSFER.

The embryo transfer (ET) is a complex reproductive procedure and it includes several assisted reproductive techniques/technologies (ART) such as superovulation, artificial insemination, embryo recovery, in vitro fertilization, gamete and embryo freezing, in vitro culture, embryo transfer, estrus synchronization/induction, etc.. The ET developed very fast from the end of 70s, because the farmers recognized very fast that the application of ET offers many advantages for practical animal breeding. The authors give an overview from the Hungarian history of practical sheep ET applied to animal breeding. In the 1980-s significantly higher number of sheep ET was carried out in Hungary than in the previous decades.

BEVEZETÉS

Az asszisztált reprodukciós technikák (ART) csoportjába tartozó eljárásokat - az emberben és az állatban egyaránt - a szaporodási folyamatok, és azon belül elsősorban a megtermékenyülés létrejöttének támogatására használják. Az ART csoportjába tartozó eljárások a teljességre törekvés igénye nélkül: mesterséges termékenyítés (MT), ivarzás/ovuláció szinkronizálása/indukciója + időzített MT, szuperovuláció + embrióátültetés (ET), ivarsejtek és az embrió fagyasztása (tartós tárolása), in vitro termékenyítés/embriótermelés, mikromanipulációs technikák (embrióbiopszia + preimplantációs genetikai diagnózis, ivarmeghatározás, mikroinszeminációs eljárások, stb..

Az emberben és a háziállatokban alkalmazott asszisztált reprodukciós eljárások technikai vonatkozásai nagyon hasonlóak. Az asszisztált reprodukció (AR) indikációjában azonban lényeges különbség van. Az állatorvosi AR-ban csak olyan egyedek vesznek részt a programban, amelyek szaporodásbiológiai szempontból teljesen egészségesek (fertilisek), tehát az ART-t nem gyógykezelési célból, hanem a „szaporodási képesség” növelése és a minél több utód megszületése érdekében alkalmazzák. Embernél az ART felhasználásának egyedüli célja a meddő házaspárok gyermekáldáshoz segítése. Ezért az ART-t csak olyan esetekben alkalmazzák, amikor a házaspár valamelyik tagjánál, esetenként mindkettőnél, csökkent reprodukciót vagy meddőséget diagnosztizáltak. Ennek megfelelően emberben az AR és az ART alkalmazásának célja a részleges vagy teljes infertilitás/meddőség gyógykezelése.

Az EÁ komplex asszisztált reprodukciós eljárás, ami több ART foglal magában, mint pl. szuperovuláció, MT, embriókinyerés, in vitro termékenyítés, ivarsejt- és embriómélyhűtés, in vitro tenyésztés, embrió beültetés, stb.. Az EÁ az 1970-es évek végétől hihetetlenül gyorsan fejlődött, ami elsősorban annak volt köszönhető, hogy a tenyésztők hamar felismerték, hogy a módszer alkalmazása a gyakorlati állattenyésztést nagyban segíti, és számos előnnyel jár. Háziállatokban és így a juhban az EÁ alkalmazására azért kerül sor, hogy a genetikailag értékes tulajdonságokat hordozó egyedektől a természetes körülmények között életük során várhatóan megszületendő utódok számánál lényegesen többet „állítsanak” elő. Azonban további előnyei is lehetnek, mint például: az állomány átlagánál jobban teljesítő egyedek gyorsabb elszaporítása, ritka fajták létszámának gyors növelése, az intenzív állattenyésztés követelményeinek már megfelelni nem képes, de a világörökség részét képező és ezért az utókor számára megóvandó őshonos állatok megmentése és fenntartása, minimális az állategészségügyi kockázat, stb.. Mélyhűtött ivarsejtekből (spermium és petesejt) és embriókból génbankok alakíthatók ki, ahol a ritka és veszélyeztetett fajok/fajták és az értékes tenyésztési tulajdonságokkal bíró egyedek genetikai anyaga megőrizhető. Az élő állatokkal folytatott tenyészállat-kereskedelmet felválthatja az embriók kereskedelme, ami költségtakarékos, könnyen lebonyolítható, nem kell akklimatizációs problémával számolni és állat-egészségügyi szempontból is biztonságosabb, hiszen a fertőző állatbetegségek behurcolásának veszélye lényegesen csökkenthető.

Az EÁ hátrányai között említik, hogy költséges eljárásról van szó, továbbá, hogy a módszernek van egy nagyon gyenge láncszeme: a szuperovuláció. A szuperovuláció terén nem történt lényeges előrehaladás az elmúlt 20 évben. A

donoronként nyerhető hasznos embriók átlagos száma napjainkban is 5-6 között alakul és változatlanul nem tudjuk előre jelezni, hogy a donor reagál-e a hormonkezelésre vagy sem. További hátrány, hogy gyakorlott, jól képzett személyzetre van szükség, és értékes laboratóriumi berendezéseket kell használni.

A juh EÁ-t kiterjedten alkalmazzák a kutatásban is (Moore és Shelton, 1964; Brüssow és 1999). Ugyanakkor, kiskérődzőkben lényegesen kevesebb embriót ültetnek tenyésztési célból, mint szarvasmarhában, de nagyságrendileg több juhembriót transzferálnak, mint kecskét (lásd fentebb). Az első juh EÁ-re 1949-ben került sor (Warwick és Berry, 1949). Az alkalmazott technikát Hunter és mtsai (1955), valamint Moore és Shelton (1964) fejlesztették tovább. A módszer median laparotomiára alapult, mert az anyajuh nyakcsatornájának sajátos az anatómiája - szemben a szarvasmarhával - és nem teszi lehetővé a katéter bevezetését a méhbe. Ezért a nem sebészi embrió kinyerést és beültetést juhban nem lehet alkalmazni (ellentétben a szarvasmarhával). A 80-as évek közepétől kezdtek megjelenni azok a cikkek, amelyekben a kutatók arról számoltak be, hogy a MT-nél alkalmazott laparoszkópos eljáráshoz hasonlóval sikerült embriókat kinyerniük és visszaültetniük (McKelvey és mtsai, 1985; McMillian és Hall, 1994; Amiridis és Cseh, 2012; Cseh és mtsai, 2012). Nem sebészi embrió kinyerési és beültetési technika kidolgozása is folyamatban van, de az eredmények ma még a várakozáshoz képest elmaradnak (Cognie, 1998; Amiridis és Cseh, 2012). A sebészi és a laparoszkópiás technika ötvöztetésével is próbálkoznak a szakemberek (Amiridis és Cseh, 2012). A laparoszkópiás technika embrió kinyerésre és beültetésre (de különösen az előbbire) való alkalmazása, üzemi körülmények között igen nagy türelmet és gyakorlatot kíván meg. Gyakran előfordul, hogy a technikai nehézségek miatt a beavatkozás elhúzódik, vagy nem kellően hatékony (embrió kinyerési arány alacsony). A kereskedelmi EÁ programok többségénél ezért napjainkban még a sebészi beavatkozást részesítik előnyben, elsősorban az embriók kinyerésénél, de gyakran a beültetésekénél is (vagy a laparoszkópiával kombinált technikát).

A kiskérődzőkben végzett embrióátültetések összesített adatait az a következőkben mutatja be (Nemzetközi Embrió Átültető Társaság; International Embryo Transfer Society; IETS 2009-2010, IETS, 2011).

Faj	Átültethető embriók száma	Átültetett embriók száma		
		Friss	Fagyasztott	Összesen
Juh	32614	26480	2598	29078
Kecske	539	1619	14	1633
Összesen	33153	28099	2696	30711
Összesen 2009-ben	35697	2473	355	2828

Az Üllői Embrióátültető Állomáson az embrióátültetéssel és a kapcsolódó technikákkal elért eredmények (1979-2000) a következők voltak:

Eredmény	Év
Az első borjú megszületése mélyhűtött embrióból	1983
Az első bárányok megszületése fagyasztott embrióból	1983
Embriófelezés/kiméra embriók előállítása osztrák és német szakemberekkel közösen; indukált ikerelés EÁ-sel	1984-86
Import (1050 db) és hazai (kb. 1000 db) előállítású fagyasztott és friss juh embriók beültetése	1982-86
Az első magyar szürke borjú megszületése in vitro fertilizáció eredményeképpen (a Gödöllői MBK-val közösen)	1992
Az első borjú megszületése tenyészpárosítást követően in vitro fertilizációval előállított és mélyhűtött embrióból (Enyingi Mezőgazdasági Kombináttal közösen)	1994
Megszületnek az első bárányok in vitro fertilizációval előállított embriókból	1995
Az első csikó megszületése embrióátültetésből	1996
Transzgenikus nyúl/sertés program (német és osztrák szakemberekkel közösen)	1992-97

Magyarországon 1982-ben, az Üllői Embrióátültető Állomáson kezdődött a juh embriók nagy számban való átültetése Ausztráliából importált fagyasztott embriókkal. Egy évvel később indult a hazai üzemekben történő alkalmazása elsősorban törzstenyészetekben, tenyészállatok előállítása céljából. Az átültetéseket az üllői állomás munkacsoportja végezte. Az 1979-ben alapított és 2000-ig működő Üllői Embrióátültető Állomáson a gyakorlati EÁ-sel összefüggő kutatás-fejlesztéssel, az import szarvasmarha- és juh embriók fogadásával/beültetésével, valamint az EÁ és más reprodukciós módszerek hazai nagyüzemekben történő bevezetésével foglalkoztak. Számos, a kutatással és a gyakorlati alkalmazással kapcsolatos siker fűződik az állomás nevéhez (lásd fentebb). 1982 és 1986 között közel 850, majd 1989-ig további 200 fagyasztott import juh embrió került beültetésre Üllőn. Törzstenyészetekben 1982 és 1989 között közel 1000 friss juh embriót ültettek be. Az átlagos vemhesülési arány 50% körül alakult.

2010 óta a SZIE ÁOTK-án működik egy – a hazai és nemzetközi feltételeknek megfelelő - akkreditált juh mesterséges termékenyítő és embrióátültető ún. mobil laboratórium/állomás. Az említett laboratórium 2008-ban és 2009-ben néhány tucat embrióval végzett kísérleti juh EÁ-eket. Egy évvel később, 2010 és 2011-ben a SZIE ÁOTK embrióátültető csoportja a DE munkatársaival közösen 300 import fagyasztott és 50 friss juh embriót ültetett be.

Ahogy az a fenti adatokból kiderül a 80-as években sokkal nagyobb számban végeztek juh EÁ-eket hazánkban, mint az elmúlt évtizedekben. A MT esetében hasonló intenzív csökkenésről lehet beszámolni, hiszen a 80-as évekhez képest, amikor az anyajuh állomány kb. 80%-át (egyések szerint 90%-át) inszeminálták, napjainkban még óvatosan derűlátó becslések szerint is az anyajuhoknak csak max. 1-2 százalékát termékenyítik.

A VIZSGÁLATOK EREDMÉNYEINEK RÖVID BEMUTATÁSA

Vizsgálataink célja elsősorban a juh EÁ eredményességét befolyásoló tényezőknek a kutatása. Tanulmányoztuk, hogy egy vagy két embrió beültetése után a

recipiensek vemhesülése hogyan alakul. Azt tapasztaltuk, hogy az egy és az iker embrió beültetés a recipiensek vemhességi arányában szignifikáns különbséget nem okozott (145/283, 51,2% vs. 34/52, 65,4%; $p < 0,001$). Iker embriók ültetésekor a recipiensek 29,4%-a mellett iker bárányokat (10/34). Ugyanakkor az embrió túlélési arányban nem tapasztaltunk különbséget (145/283, 51,2% vs. 44/104, 42,3%) a két csoport között.

Összehasonlítva a különböző korban (a donorok mesterséges termékenyítését követő 4., 5. és 6. napon gyűjtött), illetve fejlettségi stádiumban beültetett embriókkal elért vemhesülési eredményeket nem tapasztaltunk különbséget a vemhesülési eredményekben a csoportok között:

Az embrió kora (nap)	Beültetett embriók száma	Megszületett bárányok száma	Túlélési arány (%)
4	25	14	56
5	17	9	52
6	27	14	52

Vizsgáltuk, hogy az ivarzás-szinkronizálás befolyásolja-e a recipiensek vemhesülését EÁ után. Az ivarzást hüvelyszivaccsal (Chronogest, Intervet, Hollandia) szinkronizáltuk és eltávolításakor 300 NE eCG-vel (Folligon, Intervet, Hollandia) kezeltük az állatokat im.. A kontroll/kezeletlen csoportnál természetes ciklusra ültettük az embriókat. Az ivarzás-szinkronizált és a természetes ciklusban (kontroll csoport) beültetett recipiensek csoportjában az alábbi vemhesülési eredményeket értük el:

Vizsgálati csoportok	Recipiensek száma		
	Beültetett		Vemhes
	n	n	%
Nem szinkronizált	27	18	55.5
Szinkronizált	44	26	59.1

A szinkronizált és a nem szinkronizált csoportok vemhesülési eredményei között nem találtunk különbséget (55,5% vs. 59,1%).

Vizsgáltuk az EÁ-ben részt vett állatok szaporodásbiológiai utóéletét. Adatokat gyűjtöttünk és elemeztük, hogy a programokban részt vett donorok mennyi idő elteltével vemhesültek. Azt tapasztaltuk, hogy a szuperovuláció és a sebészi embriókinyerés ellenére a donorok 80%-a ($n=45$) a programot követő egy éven belül vemhesült és 44 bárányt ellett. Rendkívül érdekes, hogy a 45 donorból 12 a szuperovuláció alkalmával alkalmazott termékenyítésből maradt vemhes és 15 bárányt ellett (12/45; 26,6%). Ez azt jelenti, hogy a sebészi embriókinyerés és a méh átöblítése sem akadályozta meg az embriók megtapadását. A fennmaradó 24 donor a programokat követő 4 hónapon belül ivarzott, amelynek során sikeresen termékenyítették őket (24/45; 53,3% és a termékenyítésekből 29 bárány született.

A kérdőzők reprodukcióját nagymértékben befolyásolja többek között a táplált-

sági állapot, amit a takarmányozás színvonala határoz meg. Az optimális energia, fehérje, vitamin és ásványi anyagellátás az EÁ sikerére, eredményére is hatással van. Adatok bizonyítják, hogy nem megfelelő takarmányozás - többek között - hátráltatja a tüszők fejlődését, az ovulációs számot, a luteális funkciót (sárgatest-működés) és az embrió fejlődését, stb.. Keveset tudunk még a szub-optimális takarmányozásnak az EÁ-re gyakorolt hatásairól (szuperovulációs reakció minősége /embriószám/, embrió minősége, beültetett embriók implantációja/vemhesülési arány, stb.). Számos vérparaméter alkalmas az állat tápanyag ellátottsága minőségének elemzésére, mint például: nem eszterifikált zsírsavak (NEFA), béta-hidroxy-butirát (BHB) és total fehérje (TP), karbamid, koleszterin, stb..

Az anyagforgalommal kapcsolatos vizsgálatokat a SZIE ÁOTK Állathigiéniai tanszékének munkacsoportjával közösen végeztük. A vérparaméterek meghatározását és az eredmények értékelését ezúton is köszönjük, mindennekélőtt Dr. Jurkovichs Viktornak. Különösen hálásak vagyunk Brydl Endre professzor úrnak, a tanszék vezetőjének, aki a vizsgálatokat engedélyezte. Az adatok értékelése folyamatban van, de néhány részeredmény már rendelkezésre áll. Az eredmények azt mutatják, hogy a gyűjtött embriók száma pozitív kapcsolatban áll a progeszteron szinttel, valamint a karbamid, koleszterin és a NEFA szintekkel. Az átültethető minőségű embriók száma a koleszterin és a NEFA szintekkel mutatott pozitív kapcsolatot. A karbamid esetében viszont negatív összefüggést találtunk.

Az eddig rendelkezésre álló, az anyagforgalmi vizsgálatokkal kapcsolatos előzetes eredményeket összefoglalva megállapíthatjuk, hogy az állatok takarmány-ellátottsága hatással van a szuperovulációs hormonkezelés sikerére, a nyert embriók számára és minőségére. Különösen fontos a szub-optimális tápanyag-ellátottság elkerülése és minél korábbi felfedezése, hiszen ilyenkor klinikai tünetek még nem hívják fel a figyelmünket a bajra, de a reprodukciós folyamatok már nem optimálisan „működnek”.

A bevezetőben már utaltunk arra, hogy az emberben és a háziállatokban alkalmazott ART módszertani vonatkozásai megegyeznek és/vagy nagyon hasonlítanak egymásra. A SZIE ÁOTK Andrológiai és Asszisztált Reprodukciós Laboratóriuma és a Szent János Kórház Budai Meddőségi Centruma között több mint 10 éve van kutatási együttműködés. A petesejtfagyasztás terén végzett közös szakmai munka eredményeként született meg 2006-ban az első gyermek Magyarországon mélyhűtés és felolvasztás után termékenyített petesejtből. Ez a siker egyben azt is jelenti, hogy hazánk a világon a 8., Európában a 3. és a közép-kelet-európai régióban az első olyan ország, ahol fagyasztott petesejtből gyermek született. 2006 óta további gyermekek jöttek a világra mélyhűtött petesejtből és mindegyik gyermek egészségesen fejlődik.

IRODALOM

- Amiridis, G. - Cseh S. (2012): Assisted reproductive technology in the reproductive management of sheep and goats. *Anim Reprod Sci*, 130. 152-161.
- Brüssow, P. - Rátky J. - Torner, H. - Sarlós P. - Solti L. (1999): Contribution of porcine follicular fluid in the process of fertilization in vivo. *Reprod. Dom. Anim.*, 34. 139-145.
- Cognie, Y. (1998): State of the art in sheep-goat embryo transfer. *Theriogenology*, 51. 105-116.

- Cseh S. - Faigl V. - Amiridis, G. (2012): Semen processing and artificial insemination as part of health management of small ruminants. *Anim. Reprod. Sci.*, 130. 187-192.
- Hunter, GL. - Adams, CE. - Rowson, LE. (1955): Inter-breed ovum transfer in sheep. *J. Agric. Sci. (Camb)*, 46. 143-149.
- McKelvey, WAC. - Robinson, J.J. - Aitken, R.P. - Henderson, G. (1985): The evolution of a laparoscopic insemination technique in ewes. *Theriogenology*, 24. 519-524.
- McMillian, W.H. - Hall, D.R.H. (1994): Laparoscopic transfer of ovine and cervine embryos using the transpic technique. *Theriogenology*, 42. 137-146.
- Moore, N.W. - Shelton, J.N. (1964): Egg transfer in sheep. Effect of degree of synchronization between donor and recipient, age of egg, and site of transfer on the survival of transferred eggs. *J. Reprod. Fertil.*, 7. 145-150.
- Warwick, NL. - Beryy, RO. (1949): Inter-generic and intra-specific embryo transfers in sheep and goats. *J. Hered.*, 40. 297-303.

Szerzők címe: Cseh S. - Brydl E. - Jurkovics V. - Solti L. - Faigl V.

SZIE, Állatorvos-tudományi Kar

Authors' address: SZIE, Faculty of Veterinary Science

1078 Budapest, István u. 2.

Vass N

DE, Diószegi Sámuel Agrárinnovációs Intézet

University of Debrecen, Institute of Agrarinnovation

4032 Debrecen, Böszörményi u. 138.