

Prospects of  
in vitro culture and  
cryopreservation of  
preantral follicles –  
experiences  
from three species

L. Bordás  
D. Török  
S. Cseh\*  
B. Somoskői\*\*

Állatorvostudományi Egyetem,  
Szülészeti Tanszék  
és Haszonállat-gyógyászati Klinika  
H-1078, Budapest, István u. 2.

\*megosztott vezető szerzőség  
#e-mail: somoskoi.bence@univet.hu

# Lehetőségek az izolált preantralis tüszők mélyhűtésében és tenyésztésében – tapasztalatok három fajból

Bordás Lilla, Török Dóra, Cseh Sándor\*, Somoskői Bence\*\*

## ÖSSZEFOGLALÁS

A szerzők vizsgálták a különböző vitrifikációs technikák (kriocső és open pulled straw) hatását preantralis tüszők túlélésére a felolvasztás után. A túlélési arányt a felolvasztott tüszők *in vitro* tenyésztésével tesztelték, amelynek során nyomon követték a tüszők növekedését és ösztadioltermelését. A tüszők *in vitro* tenyésztése rendkívül jelentős mennyiségű petesejthez biztosíthat hozzáférést, amelyek *in vitro* maturálhatók és termékenyíthetők, a kifejlődött embriók beültethetők vagy fagyasztva tárolhatók. A tanulmány célja a tüszőprezerváló protokollok fejlesztése, amelyeknek potenciális alkalmazásai lehetnek konzervációbiológia és a termékenységmegőrzés területén.

## SUMMARY

**Background:** The cryopreservation of preantral ovarian follicles offers an alternative for extending the reproductive lifespan of animals with high genetic value or those that are endangered. Additionally, it holds significance in human medicine for fertility preservation prior to chemotherapy treatments. Since mammalian ovaries contain a substantial number of preantral follicles, the *in vitro* culture of thawed follicles could provide access to a significant quantity of oocytes, which can be matured and fertilized *in vitro*. The resulting embryos can either be transferred or cryopreserved for future use.

**Objectives:** The aim of the current study is to summarize previous results regarding the *in vitro* culture of preantral follicles (PAF) in laboratory animals (mice) and companion animals (dogs), as well as to provide new data on the possibilities related to PAF *in vitro* culture (IVC) in livestock animals (pigs).

**Materials and Methods:** Follicles were isolated from ovaries and divided into three groups: fresh, OPS vitrified and cryotube vitrified, and cultured *in vitro*. Throughout the *in vitro* growth period, follicle diameter and estradiol production were monitored.

**Results and Discussion:** OPS (and open vitrification systems in general) could be suitable for the simultaneous cryopreservation of a large number of isolated follicles. The technique ensures viability for short-term *in vitro* culture after thawing.

Az elmúlt évtizedekben az asszisztált reprodukciós technikák (ART) alkalmazása az orvos- és állatorvostudomány egyik leggyorsabban fejlődő területévé vált. A reprodukció segítése és a termékenység megőrzése („fertility preservation”) érdekében alkalmazott, az őssejtek, embriók, ivarsejtek és szövetek krioprezerválására szolgáló új technikák és protokollok fejlesztésével számos tanulmány foglalkozik [1]. Emberekben kiemelt jelentősége van azoknak az ART-knek, amelyek daganatos betegek fertilitásának/termékenységének megőrzését célozzák. A sugár- és kemoterápia előtt gyűjtött ivarsejteket vagy embriókat a kezelések végéig mélyhűtve tárolják, így elkerülhető a kezelések okozta károsodás a spermiumokban/petesejtekben/embriókban [2]. Állattenyésztési vonalon pedig a konzervációbiológiai szempontok érvényesülnek elsősorban.

**A genetikai anyag  
megőrzése és védelme  
nagyon fontos a  
veszélyeztetett  
vagy őshonos fajok/  
fajták esetében**

**A hereszövetek  
fagyasztásához  
hasonlóan a  
petefészekszövet  
is mélyhűthető**

### KONZERVÁCIÓBIOLOGIA

A genetikai anyag megőrzése és védelme nagyon fontos a veszélyeztetett vagy őshonos fajok/fajták esetében, amelyek ki vannak téve a génerózióknak és a kihalás kockázatának. Az ART a konzervációbiológiában is kiemelt jelentőségű, mivel a házi-, ill. haszonállatokon alkalmazott eljárások [3] alkalmazhatók a veszélyeztetett fajok genetikai anyagának hosszú távú védelmére, megőrzésére [4]. Jelenleg a nagy genetikai értékű egyedek megőrzése főként az ejakulátum, ill. spermiumok mélyhűtését jelenti, míg a nőtények esetében gyakran nehézségbe ütközik az ivarsejt (petesejt) gyűjtése, mélyhűtése. A fajfenntartás történhet *in situ* és *ex situ*, attól függően, hogy az állatokat természetes élőhelyükön, vagy mesterséges környezetben tartják-e [5].

Mivel a petefészek kéregállományában több százezer éretlen petesejtet tartalmazó tüsző található, ezek gyűjtése, *in vitro* tenyésztése (*in vitro* culturing, IVC), mesterséges termékenyítése (*in vitro* fertilization, IVF) és/vagy fagyasztása (cryopreservation, CP) lehetővé teszi nemcsak a fajták örökítő anyagának hosszú távú tárolását génbankokban, de a váratlanul elhullott, nagy értékű nőtény egyedtől később utódokat is létre tudunk hozni [6].

### PETEFÉSZEKSZÖVET ÉS PREANTRALIS TÜSZŐK FAGYASZTÁSA

A hereszövetek fagyasztásához hasonlóan a petefészekszövet is mélyhűthető. A szövetfagyasztásnál nagy kihívást jelent a jól permeabilizáló (a sejtekbe/szövetekbe könnyen bejutó) krioprotektánsok (védőanyagok) kiválasztása, a megfelelő hűtési sebesség megválasztása, valamint a különböző fejlődési stádiumban lévő, felhasználásra alkalmas tüszők előfordulása a szövetben [1]. Az eddig elért igéretes eredmények ellenére a petefészekszövet és a preantralis tüszők (preantral follicles, PAF) fagyasztása, valamint a tüszők *in vitro* tenyésztése a legtöbb fajban még mindig nem számít megoldott kérdésnek. Stabilan működő protokollok hiányában az eljárás még messze van a gyakorlati alkalmazástól [6].

A petefészekszövetek fagyasztását sikeresen alkalmazták néhány állatfaj (pl. juh, szarvasmarha, kecske, sertés) esetében [7]. Kutyanál szintén számos kísérlet irányult a megfelelő vitrifikációs protokoll kidolgozására [8–13], valamint a felolvasztott petefészekszövetek xenotranszplantációjára. Ezeknek a vizsgálatoknak a tapasztalatai azt sugallják, hogy a kutyák petefészekszövege sikeresen vitrifikálható [8, 10, 12], azonban a xenotranszplantációt követően elkerülhetetlen a fagyasztásból adódó kriosérülés és a tüszővesztesség [8].

A humán IVF területén a petefészekszövet mélyhűtése, valamint a felolvasztott minta autotranszplantációja hatalmas áttörést hozott mint a kemoterápiát megelőző fertilitásmegőrző eljárás. A módszernek köszönhetően az első gyermek 2004-ben született [14] és azóta több mint 150 gyermek született világszerte [15]. Fontos azonban megjegyezni, hogy ennek a módszernek is vannak korlátai. A petefészekszövet begyűjtése jó lehetőségnek tűnik, azonban a kortikális régió visszaültetése révén kiújuló daganat kockázatát jelenleg nem lehet megbecsülni.

**A preantralis tüszők  
bármely életkorú,  
ciklusú, de akár frissen  
elhullott állatból  
is kinyerhetők**

Ennek következtében a rosszindulatú szisztémás daganatos megbetegedésben szenvedők petefészekszövetének autotranszplantációja nem javasolt [16]. További hátrány a krioprezerváció miatt bekövetkező tüszővesztés, ill. a tüszők petefészekszekszekteleken belüli egyenlőtlen eloszlása. Emiatt az elmúlt néhány évben egyre nagyobb az érdeklődés a preantralis tüszők felhasználása iránt. Az izolált tüszők gyűjtése lehetővé teszi a tüszők számának pontos regisztrálását és minőségi bírálatát a fagyasztás előtt, valamint csak meghatározott számú tüsző felolvasztását [17, 18]. A felolvasztott tüszők *in vitro* tenyésztése (és az ebből adódó ellenőrzött körülmények) révén elkerülhető a különböző fertőzések esetleges átvitele [19].

A preantralis tüszőkben található petesejtek mérete nem éri el az érett petesejtéket, csak néhány granulosa-sejtréteg veszi őket körül, kicsi a metabolikus aktivitásuk, valamint kevés intracitoplazmatikus lipidet tartalmaznak. Ebben a stádiumban a petesejt meiózisa a profázisában megáll, emiatt elméletileg kisebb a citogenetikai hibák kockázata [20]. A preantralis tüszők a térfogatukhoz képest nagy felülettel is rendelkeznek, ami kiváló diffúziót / anyagáramlást (permeabilitási viszonyokat) biztosít a kriptoprotektánsok számára, ezért ezek a tüszők ellenállóbbak a fagyasztással / fagyasztási sérülésekkel szemben. A preantralis tüszők bármely nőtény állatból gyűjthetők, függetlenül azok korától vagy az ivari ciklus szakaszától, de akár frissen elpusztult állatokból is kinyerhetők [21–23].

A krioprezerváció két módszerrel végezhető: lassú (programozott) mélyhűtéssel (slow freezing, SF) vagy vitrifikációval (VF). Lassú fagyasztás esetén a sejtek, ill. szövetek mélyhűtés okozta sérüléseit a kriptoprotektánsok kis koncentrációjával, valamint lassú hűtési sebesség alkalmazásával és a jégkristályképződés mesterséges beindításával (seeding) igyekeznek elkerülni. A folyamat meglehetősen időigényes átlagosan 90–120 percet vesz igénybe. A vitrifikáció lényege az ultrarapid hűtési sebesség (20 000 °C/perc) és a kriptoprotektánsok nagy koncentrációban történő alkalmazása, amelyek kombinációjával a jégkristályképződés elkerülhető [24].

Ugyan mindkét technikának megvannak a maga előnyei és hátrányai, az utóbbi évtizedben a petesejt- és embriómélyhűtés területén egyre elterjedtebbé vált a vitrifikáció rutinszerű alkalmazása, elsősorban a humán klinikai IVF-ben. Azonban kereskedelmi szarvasmarha ET-ben, a gyakorlatban történő könnyen alkalmazhatóság érdekében, változatlanul a direkt embriótranszferrel kombinálható lassú fagyasztást alkalmazzák elsősorban. A humán IVF-ben a vitrifikáció térhódítását nemcsak munkaszervezési és gazdasági szempontok, de a vitrifikáció nagyobb hatékonyságát igazoló tanulmányok is indokolják. Azonban a mélyhűtés, függetlenül attól, hogy vitrifikációval vagy lassú fagyasztással végezték, a szövetekben elkerülhetetlenül ultrastrukturális károsodásokat okoz. A tüszőkben morfológiai anomáliák, mint pl. abnormális alak, petesejtet érintő degeneráció, sejtmag-zsugorodás (karyopichnosis), vagy különösen a preantralis tüszőkben citoplazma- és sejtmag-expandáció figyelhető meg [25, 26] ami üres tüszőket eredményezhet [27]. Ezekkel a hatásokkal szemben a granulosa-sejtek kevésbé érzékenyek, de a cumulus-oocita komplexek szomatikus és germinális kompartmentjei közötti kommunikáció sérülhet [26, 27]. Ebből a szempontból a primordialis, ill. preantralis tüszők a legellenállóbbak, és a későbbi növekedésük során is képesek leküzdeni a subcellularis struktúráikat ért károsodások egy részét [26].

### PREANTRALIS TÜSZŐK *IN VITRO* TENYÉSZTÉSE

A preantralis tüszők tenyésztését lehetővé tévő rendszer kifejlesztésének első lépése a megfelelő tápoldat meghatározása, majd a különböző kiegészítő oldatok hatásának vizsgálata, önmagában vagy kombinációban [28].

A petefészektüsző az emlőspetefészek szerkezeti és funkcionális egysége, amely biztosítja a petesejtek növekedéséhez és éréséhez szükséges mikrokörnyezetet [29–31]. Follikulogenezis során a petefészekben nagyszámú primordialis tüsző van jelen, amelyek túlnyomó részben atretizálódnak és csak néhány fejlődik a

**A preantralis tüszők teljes *in vitro* fejlődéséhez még nincs kidolgozott módszer**

preovulatorikus, majd ovulatorikus stádiumba, amelyet a petesejt ovulációja követ. A legújabb tanulmányok szerint a tüszőatrézia hátterében apoptózis mechanizmusa áll [32]. Kimutatták, hogy az apoptózis szabályozásában szerepet játszanak gonadotropinok és a növekedési faktorok. Az FSH jelenléte képes elnyomni a tüszősejtek apoptózisát humán preantralis tüszőkben [33] valamint a pre- és korai antralis és preovulatorikus tüszőkben [29, 34–36].

Különböző módszereket dolgoztak ki a preantralis tüszők izolálására és tenyésztésére egér [37], patkány [38], hörcsög [39], sertés [40], szarvasmarha [41, 42], és humán [33, 43] petefészkekből. Eddig egér primordiális tüszők [28] és korai preantralis tüszők [29] *in vitro* tenyésztéséből nyertek érett, MII fázisú petesejteket. A preantralis tüszők teljes *in vitro* fejlődésének feltételeit azonban sem emberben, sem háziállatokban nem sikerült létrehozni. Ez a nehézség valószínűleg a follikulogenezis hosszának és a preantralis tüsző- és petesejtnövekedés mechanizmusára vonatkozó fajokénti különbségeknek köszönhető [36].

Minden tüszőtenyésztő rendszer alapja, hogy nagy számú, jó minőségű tüszőt tudjunk izolálni a petefészekszövetből. Az egértüszőket lehetséges izolálni túvel végzett mikrodisszekcióval [44, 45]. Háziállatok esetében azonban az egyszerű mechanikus izolálás jellemzően nem működik, köszönhetően a petefészek nagy kollagéntartalmának (szarvasmarha [40, 45] juh [47, 48] sertés [49]). Ezekben a fajokban a petefészeket kollagenázos emésztésnek vetik alá, majd ezt követően izolálják a tüszőket az említett mechanikus módszerrel.

Az *in vitro* tenyésztéshez alapvetően kétféle rendszert használnak: 2D és 3D tenyésztés [50]. A 2D tenyésztés előnye, hogy viszonylag egyszerűen kivitelezhető, akár hagyományos sejtenyésztő plate-en vagy extracelluláris matrixszal bevont edényekben [51]. A petesejt minősége, ill. a fejlődési szakaszok és az antrum megjelenése jól követhető egyszerű szteromikroszkópos vizsgálattal. A módszerrel szembeni legfőbb kritika viszont, hogy a tüsző elveszti eredeti struktúráját, ami a gap junction kapcsolatok ritkulásához, ill. egyenlőtlen eloszlásához vezethet [51]. Ez a jelenség végső soron a tüszőfejlődés megrekedését, ill. a petesejt nem megfelelő érését eredményezheti [52]. A 3D tenyésztés leggyakrabban alginát-hidrogél gyöngy alkalmazását jelenti, amelybe beágyazzák a follikulust [53]. Ennek eredményeként a tüsző megőrzi eredeti gömb formáját, amely egyes szerzők szerint hatékonyabb sejt-sejt kommunikációt eredményez [54]. Hátránya, hogy a morfológiai bírálathoz, ill. a petesejt minőségének ellenőrzése rendkívül nehézkes.

## KIHÍVÁSOK

### EGÉR

Annak ellenére, hogy először egérben hozták létre az első életképes utódokat [55], amelyek PAF IVC + petesejt IVM-ből származtak, a preantralis tüszők tenyésztése még mindig a fejlesztés szakaszában van. Liu és mtsai (2002) vizsgálataikban újszülött egerek petefészek szeleteit tenyésztették, majd a preantralis tüszőket izolálták, és további tenyésztést követően életképes utódokat tudtak létrehozni [56]. Néhány évvel később egy módosított protokollal ugyanez a kutatócsoport ismét elvesztülést produkált. Ezt azonban azóta nem sikerült megismételni más fajokon.

### KUTYA

A kutyák szaporodásbiológiája meglehetősen egyedi és eltér a többi házi emlősfajtától, emiatt különösen nagy kihívást jelent az asszisztált reprodukciós technikák (embriótranszfer, *in vitro* maturáció [IVM], az *in vitro* termékenyítés [IVF], az intracitoplazmatikus spermiuminjekció [ICSI]) alkalmazása ennél a fajnál. A sajátosságok közé tartozik a számos polyoocyta tüsző jelenléte, az éretlen petesejt ovulációja

**Kutyában nagy kihívást jelent az asszisztált reprodukciós technikák alkalmazása**

(GV stádium, nem megtermékenyíthető) és a periovulációs időszak, amely során a progeszteron koncentrációja különösen nagy [57].

A primordiális tüszők számát petefészkenként körülbelül 100 000-re becsülik [58]. Ebben a stádiumban a petesejt átmérője 25–30  $\mu\text{m}$  [59]. Ezen petesejtek egy része összekapcsolódva marad, és polyoocyta tüszőket hoz létre. Az ilyen polyoocyta tüszők előfordulása rendkívül ritka nőkben vagy egerekben (<0,2%), de szukákban meglehetősen gyakori, a tüszőpopuláció akár 15%-át is érintheti (egy tüszőben akár 17 petesejt is lehet; [60]). Számos tanulmány szerint a polyoocyta tüszők elérhetik a preovulációs stádiumot, és akár ovulálhatnak is. Az egy adott tüszőn belüli petesejtek minősége azonban eltérő, és függetlenül a petesejtek számától, mindig csak egy lesz jó minőségű, és jut el az MII fázisig [61].

Az első antrummal rendelkező tüszők a nőtény 5–6 hónapos korától vannak jelen a petefészkekben [58]. Ezek még viszonylag kis méretűek, 150–300  $\mu\text{m}$  átmérőjűek, és olyan petesejtet tartalmaznak, amely már elérte a 90–110  $\mu\text{m}$ -t, azaz a végleges átmérőjének 80%-át.

A tüszők LH-szenzitivitása (az LH-receptorok megléte) korábban jelenik meg kutyákban, mint más fajoknál. Az LH-receptorok akkor válnak kimutathatóvá, amikor a tüszők átmérője eléri kb. az 1 mm-t, ami az ovulációkori átmérő kb. 20%-a. A legtöbb más fajnál ez a jelenség akkor figyelhető meg, amikor a tüsző átmérője eléri az ovuláció idején tapasztalt átmérő kb. 50%-át [62]. Amikor a kutyában bekövetkezik az ovuláció, a petesejtek még éretlen GV stádiumban vannak (szabadulnak ki a tüszőből), és a petevezetőben való 48–72 órás tartózkodás után folytatják a meiózist, hogy elérjék a II. metafázist (MII) [63]. Ez magyarázhatja, hogy *in vitro* maturáció esetén, még ha a petesejteket a tüszőnövekedés késői szakaszában is gyűjtik, nagyon kevés petesejt képes elérni a metafázis II stádiumot *in vitro* körülmények között [64].

Ez a reprodukív komplexitás számos megválaszolatlan kérdést vet fel, így a kutya tanulmányozása lehetőséget kínál a kutyafélék (Canidae) tüsző- és petesejterés-szabályozásának megértéséhez [57, 65, 66].

## SERTÉS

Bár a sertés ideális kutatási modell lehetne a mezőgazdasági és orvosbiológiai tanulmányok számára, mivel fiziológiája, fejlődése és betegségtípusai hasonlóak az emberéhez, mégis, a nőivar fertilitásmegőrzésére irányuló krioprezervációs technikákról csak kevés tanulmány készült más fajokhoz képest [67]. Az emlősök közül a sertéspetesejt kifejezetten érzékeny az alacsony hőmérsékletre [68], ezzel is magyarázható, hogy nem számoltak be sem tüsző, sem pedig petefészekszövet fagyasztásáról [69]. A preantrális tüszőkben lévő éretlen petesejtek mélyhűtése megfelelő alternatíva lehet(ne) a nőtény genom megőrzésére sertésben is. Sertés preantrális tüszőkkel eddig kevés és korlátozott sikerű *in vitro* kísérletet végeztek [28, 36, 36, 70–74].

## CÉLKITŰZÉS

Az ÁTE Szülészeti Tanszékén működő Asszisztált Reprodukciós Kutatócsoport az utóbbi években intenzív kutatást folytat a preantrális tüszők mélyhűtése és tenyésztése területén. Jelen tanulmányunk célja, hogy összefoglaljuk eddigi eredményeinket, amelyeket laborállat (egér) és társállat (kutya) PAF *in vitro* tenyésztésével kapcsolatban értünk el, valamint új adatokat szolgáltatni a haszonállat (sertés) PAF IVC-vel kapcsolatos lehetőségekről. Az eredmények egy része már megjelent angol nyelvű folyóiratokban, teljes egészében magyar nyelven azonban most közöljük őket először és tesszük elérhetővé az érdeklődő kollegák számára.

A sertéspetesejt  
kifejezetten  
érzékeny az alacsony  
hőmérsékletre

## ANYAG ÉS MÓDSZER

### A PETEFÉSZKEK GYŰJTÉSE ÉS A FOLLIKULUSOK IZOLÁLÁSA

#### Egér

**A petefészekminták  
BDF1-egértörzsből  
származtak**

A kísérletekben BDF1-egértörzs (Országos Onkológiai Intézet, Budapest) 8–12 hetes nőtény egyedeit használtuk. Az egereket 12 óra sötét/12 óra világos fényprogramon tartottuk (21 °C-on, 65%-os páratartalom) és a tápot, valamint az ivóvizet *ad libitum* biztosítottuk. A tartási körülmények, az állatok védelméről és kíméletéről szóló 40/2013. (II. 14.) kormányrendelet kritériumainak megfeleltek (állatvédelmi engedély száma: PE/EA/1101-7/2017. Cervikális diszlokációt követően az egerek petefészkeit eltávolítottuk, és PBS +10% FBS-t (Sigma-Aldrich; Kanada) tartalmazó tápfolyadékba helyeztük. A másodlagos tüszőket (80–120 µm átmérő, petesejttátmérő 35–50 µm) 28G-s tűvel, mechanikusan nyertük a petefészkekből.

#### Kutya

**A kutypetefészkeket  
menhelyi kutyák  
ivartalanítása  
során gyűjtötték**

A petefészkek az Állatorvostudományi Egyetem Szülészeti Tanszék és Használat-gyógyászati Klinika, Kisállatklinikájának menhelyi kutyák ivartalanítását célzó programjából származtak ( $n = 17$ ; meghatározatlan keverék fajták). Az ovariohysterectomiákat több napon keresztül (10 független tenyésztési kísérlet), a klinika beosztása szerint végezték. A petefészkeket a gyűjtést követően steril 50 ml-es centrifugacsövekbe helyeztük, amelyek PBS + 10% FBS-t tartalmaztak. A mintákat szobahőmérsékleten tároltuk és 2 órán belül a laboratóriumba szállítottuk.

A petefészkek cortexét sebészi pengével kb. 1 mm<sup>2</sup>-es darabokra szeleteltük, majd kollagenázos emésztőoldatba (HEPES-t tartalmazó, módosított Medium 199 + 3 mg/ml kollagenáz) helyeztük, és 90 percig 37 °C-on inkubáltuk (DURRANT et al., 1998 módszere alapján) [59]. Az enzimes emésztést követően a preantralis tüszőket 1 ml-es fecskendőre erősített 28 G tűvel izoláltuk.

#### Sertés

**Sertésekből  
vágóhídon  
gyűjtötték  
petefészkeket**

A sertéspetefészkeket vágóhídon gyűjtöttük és magyar nagy fehér fajtájú sertésekből származtak (ÁTK Vágóhíd, Herceghalom). A mintákat a gyűjtés helyszínén 500 ml PBS-be helyeztük, majd 2 órán belül a laboratóriumba szállítottuk. A preantralis follikulusok izolálása a kutyanál leírtak szerint történt.

### PREANTRALIS FOLLIKULUSOK MÉLYHÚTÉSE ÉS IN VITRO TENYÉSZTÉSE

A mélyhűtés és IVC esetén minden fajnál ugyanazt a protokollt alkalmaztuk:

Az izolálás után a morfológiailag normális másodlagos tüszőket kiválogattuk, és véletlenszerűen három csoportba osztottuk őket: friss kontroll, OPS (open pulled straw) vitrifikáció és kriocső (cryotube, CT) vitrifikáció. Csak olyan tüszőket vontunk be a további vizsgálatokba, amelyek legalább két granulosa-reteggel, centralizált, kör alakú, sötét oocitával, ép alaphártyával rendelkeztek, és még nem tartalmaztak antrumszerű struktúrát. Az egész eljárást sztereomikroszkóp alatt végeztük (Olympus SZX7, Olympus Corporation, Tokyo, Japan).

#### Vitrifikáció

*Kriocső (Cryotube) vitrifikáció*

A tüszőket szobahőmérsékleten 4 percig inkubáltuk az ún. egyensúlyi oldatban (ES), amely alaplátsó (HEPES-módosított Medium199 + 10% FBS) + 10% EG + 10% DMSO + 0,3 M szacharóz (minden reagens a Sigma-Aldrich-től származik; Kanada) tartalmazott. Ezt követően a mintákat áthelyeztük a vitrifikációs oldatba (alaplátsó + 25% EG + 25% DMSO és 0,3 M szacharóz), amiben 45 másodpercig inkubáltuk őket. A vitrifikációs oldatban történő egyensúlyt követően a tüszőket 200 µl vitrifikációs oldatot tartalmazó kriocsőbe helyeztük (10 tüsző/cső), majd

a kriocsőveket közvetlenül folyékony nitrogénbe merítettük, és 1 hétig abban tároltuk. Felolvasztáskor a kriocsőveket 1 percre 37 °C-os vízfürdőbe merítettük. Ezután a felmelegített tüszőkből a krioprotektív anyagokat (EG és DMSO) fokozatosan, három lépésben vontuk ki, úgy, hogy a szacharózt csökkenő koncentrációban tartalmazó oldatokba helyeztük őket (alap médium + 0,3 M; 0,15 M; 0,075 M szacharóz). Minden lépés 5 percig tartott.

#### OPS-vitrifikáció

A tüszőket első lépésben Holding Mediumban (HM) (HEPES-módosított Medium 199 (Sigma-Aldrich; Kanada) + 20% FBS) „átmostuk”, majd 3 percig inkubáltuk az egyensúlyi oldatban (ES) (Holding Medium + 7,5% EG + 7,5% DMSO). Az ES-ben történő inkubációt követően a tüszőket 30 másodpercre vitrifikációs oldatba (VS) (HEPES-módosított 199-es médium + 20% FBS + 16,5% EG + 16,5% DMSO + 1 M szacharóz) helyeztük, majd OPS szalmába töltöttük őket (Open pulled straw) a kapilláriserő segítségével (10 tüsző/szalma). Végül a tüszőket tartalmazó OPS szalmákat folyékony nitrogénbe (LN2) merítettük. Az LN2-ben töltött 30 s után az OPS-t 0,5 ml-es szalmába helyeztük, amelyeket lezártunk és egy hétig LN2-ben tároltunk. A felolvasztáshoz az OPS-t eltávolítottuk a 0,5 ml-es szalmaszálból és 5 percre HM + 33% w/v szacharóz médiumba (HEPES-módosított 199-es médium + 1 M szacharóz + 20% FBS) merítettük, majd 3 ún. „mosási” lépést végeztünk, amelyek során a felolvasztott tüszőket a szacharózt egyre kisebb koncentrációban tartalmazó oldatsoron „vittük” keresztül (0,3 M; 0,15 M; 0,075 M szacharóz), annak érdekében, hogy a védőanyagokat (EG és DMSO) fokozatosan tudjuk eltávolítani a tüszőkből.

**OPS-ben,  
ill. kriocsőben  
végzett vitrifikációs  
módszereket  
használtunk össze**

#### In vitro tenyésztés

A friss, ill. mélyhűtött/felolvasztott tüszőket sejtenyésztő médium 20 µl-es cseppjeiben (1db tüsző/ csepp), olajjal lefedve (OVOIL™ - CULTURE OIL, Vitrolife; Göteborg, Svédország), inkubátorban tenyésztettük (Ultra-MEM + 5% FBS+100 mIU/ml eCG; Liu és mtsai 2002 nyomán [56]). A tápfolyadék felét (10 µl) minden második nap frissre cseréltük.

Az *in vitro* tenyésztett tüszők fejlődését kétféle tulajdonság értékelésével ellenőriztük: 1) méretnövekedés és 2) ösztrogén- (17-beta-ösztradiol, E2) termelés. A tenyésztett tüszők növekedési stádiumairól fotódokumentációt (Olympus SZX7mikroszkóp, Canon EOS2000D fényképezőgép) készítettünk, majd a képek alapján ImageJ (NIH, Bethesda MD, USA) képelemző programmal meghatároztuk az azonos stádiumú tüszők méretét. A képek 200×-os nagyításon készültek. Az ösztradiolvizsgálathoz a tenyésztés során kétnaponta lecserélt tápfolyadékokat összegyűjtöttük az azonos stádiumú tüszőkből. A tüszők fokozatos növekedésével arányos E2-termelés mértékét ELISA-módszerrel határoztuk meg (DE2693, Demeditec Diagnostics, Kiel, Germany; analitikai szenzitivitás 10,6 pg/ml; intra-assay CV<5%; inter-assay CVs 14,9% és 6,9%, az alacsony, ill. magas kontrollokra).

A megadott paraméterek mellett vizsgáltuk a tüszők túlélési arányát. Ennek során a normál morfológiájú, atréziát nem mutató képletek arányát számoltuk ki a tenyésztési periódus végén (1. ábra).

## STATISZTIKAI ELEMZÉS

A statisztikai elemzést az R szoftver 3.6.2 verziójával végeztük (R Core Team, 2019). A kiértékelést minden esetben megelőzte a normalitásvizsgálat.

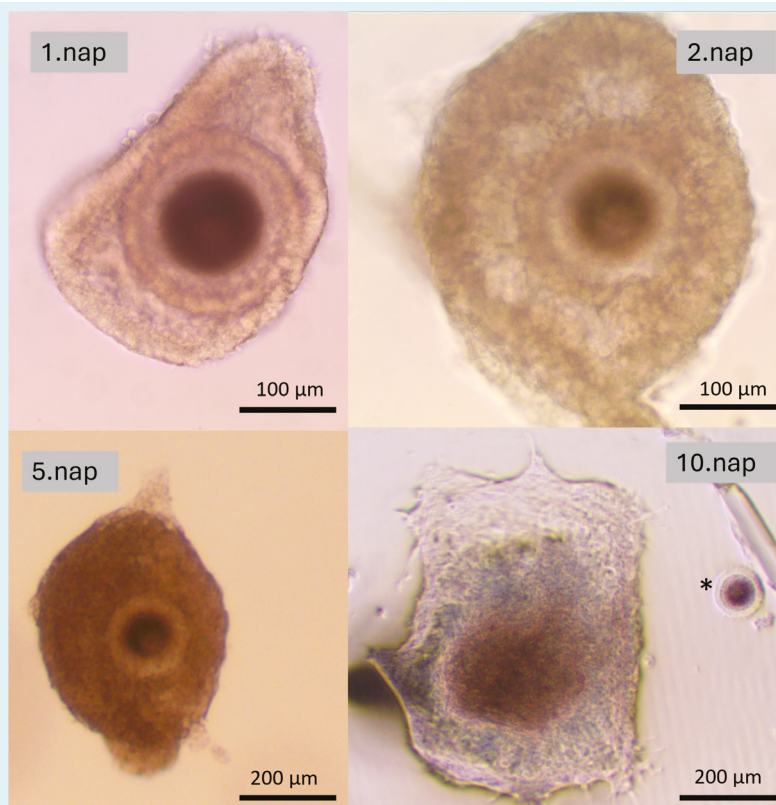
A túlélési arány csoportok közötti eltérését minden faj esetében Khi-négyzet próbával ellenőriztük.

Egérmenták esetében a tüszők átmérőinek, valamint ösztradioltermelésének növekedését páros t-próbákkal vizsgáltuk az 5. és 3., ill. a 11. és 5. napon mért

**1. ÁBRA.** Reprezentatív mikroszkópos felvételek a kutyatüszőkről az 1., 2., 5. és 10. napon

A csillag 36 órával az rLH-kezelés után ovulált petesejtet mutat. Somoskői és mtsai (2023) alapján [87]

**FIGURE 1.** Representative photomicrographs of the canine follicles on Day 1, 2, 5 and 10. Asterisk shows an extruded oocyte 36 hr after rLH treatment. Based on Somoskői et al. (2023) [87]



A kapott eredményeket statisztikai módszerekkel elemezték

értékek logaritmusát páronként összehasonlítva. Figyelembe véve, hogy többszörös összehasonlításokat végeztünk, a kapott p-értékeket Bonferroni-Holm-, a kapott konfidencia intervallumokat Bonferroni-módszerrel korrigáltuk.

A kutya minták esetében az adatok nem mutattak normális eloszlást, ezért nem paraméteres próbákat alkalmaztunk a csoportok összehasonlításához, a medián értékeket alapul véve mind a növekedés, mind a hormontermelés esetén. Ennek megfelelően a csoportok közötti eltérést Kruskal-Wallis-tesztel ellenőriztük, a páronkénti különbségek vizsgálatára Dunn-tesztet alkalmazva (Benjamini/Hochberg korrekcióval.) A csoportokon belüli különbségeket Friedman-tesztel vizsgáltuk, Wilcoxon-féle rangpróbát alkalmazva a páronkénti összehasonlításokhoz.

A sertésminták esetében a tüszőnövekedési adatok nem mutattak normális eloszlást, ezért nem paraméteres próbákat alkalmaztunk a csoportok összehasonlításához. Ennek megfelelően a csoportok közötti eltérést Kruskal-Wallis-tesztel ellenőriztük, a páronkénti különbségek vizsgálatára Dunn-tesztet alkalmazva (Benjamini/Hochberg korrekcióval). A csoportokon belüli különbségeket Friedman-tesztel vizsgáltuk, Wilcoxon-féle rangpróbát alkalmazva a páronkénti összehasonlításokhoz. Az ösztadioltermelés különbségeit ANOVA-tesztel vizsgáltuk, a páronkénti összehasonlítást Tukey-tesztel végeztük. A csoporton belüli különbségeket páros T-próbával értékeltük.

Szignifikáns eltérésnek minden esetben a  $p < 0,05$  értéket tekintettük.

## EREDMÉNYEK

### TÚLÉLÉSI ARÁNY

Megvizsgálva a három fajban tapasztalt túlélési arányt elmondható, hogy a CT-vitrifikáció minden esetben kisebb mértékű túlélést biztosított, mint az OPS-vitrifikáció, ill. az izolálást követő tenyésztés (1. táblázat).

OPS-vitrifikációval minden esetben jobb eredményeket kaptak

**1. TÁBLÁZAT.** Preantrális tüszők túlélési aránya az egyes kezelési csoportokban, különböző fajokban (a,b)  $p < 0,05$ , Khi-négyzet próba. A különbségek fajon belül, kezelési csoportok között értendő

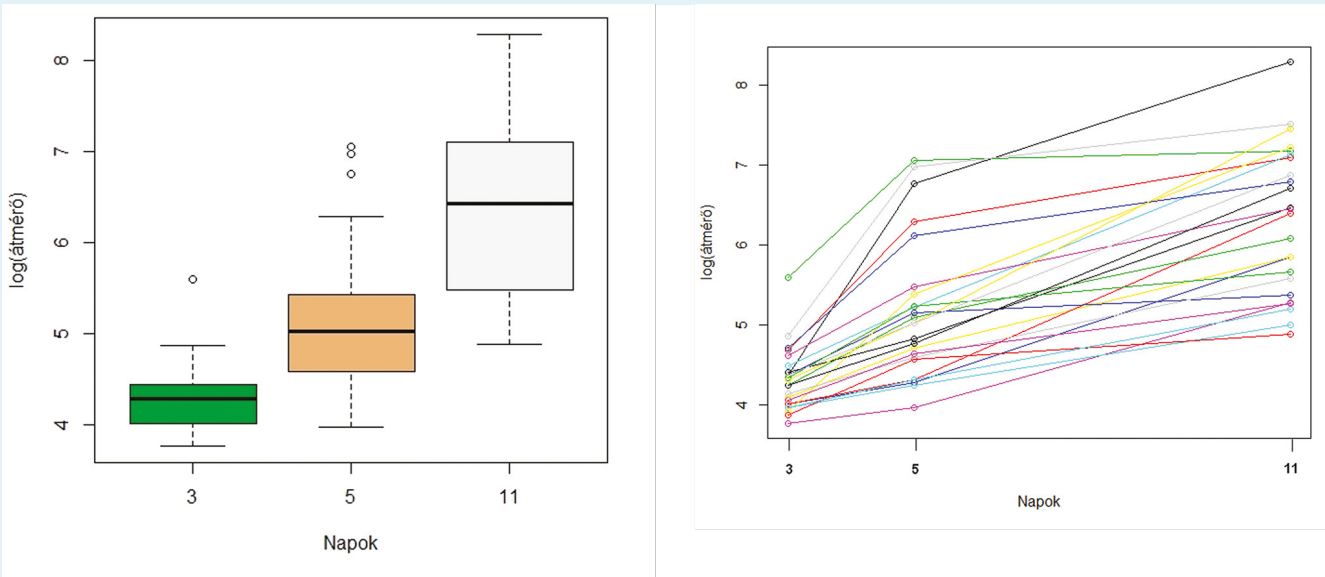
**TABLE 1.** Survival rate of in vitro cultured PAFs of different species in each treatment groups (a,b)  $p < 0.05$ , Chi-squared test

| Mélyhűtés        | Faj                       |                           |                             |
|------------------|---------------------------|---------------------------|-----------------------------|
|                  | Egér                      | Kutya                     | Sertés                      |
| Friss (kontroll) | 93 % (42/43) <sup>a</sup> | 98 % (96/98) <sup>a</sup> | 97,4 % (75/77) <sup>a</sup> |
| OPS              | 81 % (50/62) <sup>b</sup> | 95 % (55/58) <sup>a</sup> | 94,4 % (17/18) <sup>a</sup> |
| CT               | 66 % (25/38) <sup>c</sup> | 81 % (72/89) <sup>b</sup> | 83,3% (15/18) <sup>b</sup>  |

IN VITRO TÜSZŐNÖVEKEDÉS

Egér

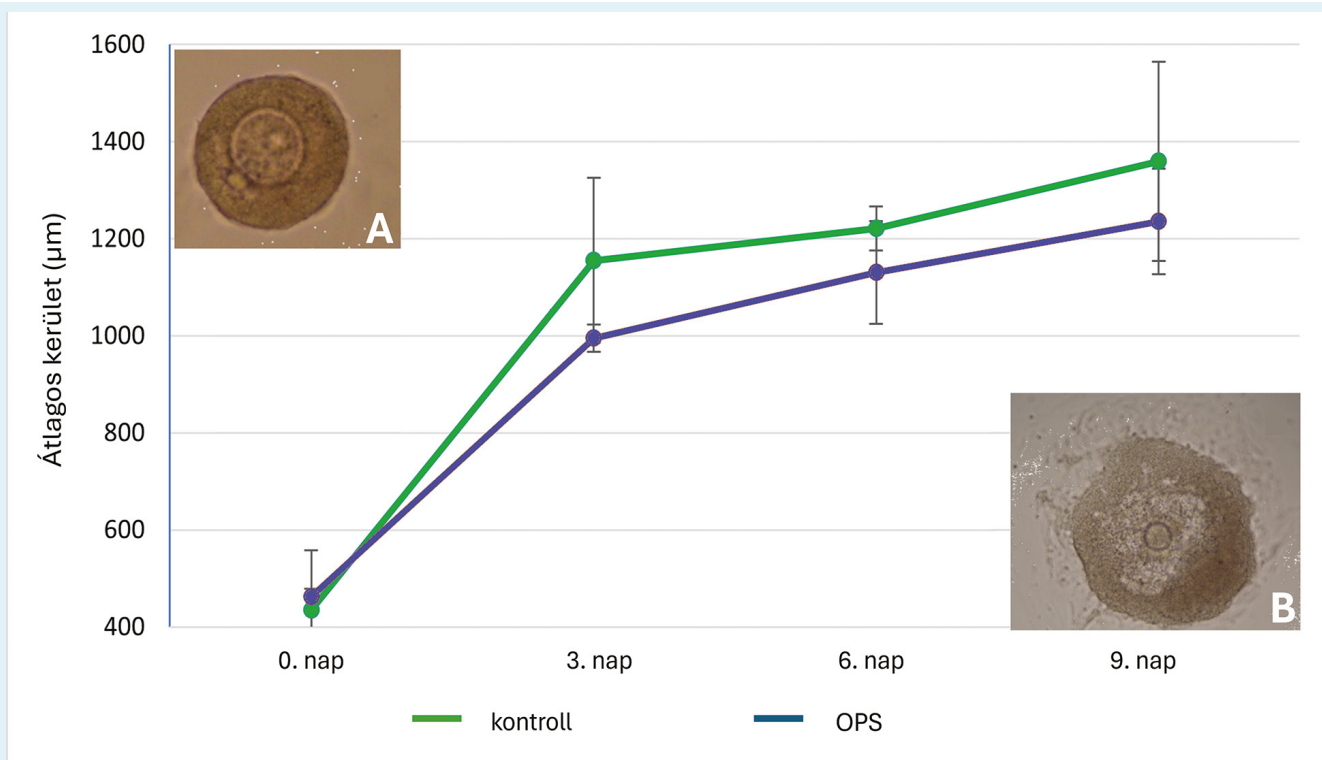
Az *in vitro* tenyésztett tüszők ( $n = 24$ ) növekedési fázisait a 3. 5. és 11. napon ellenőriztük. A 3 napos tüszők átmérője:  $81,36 \pm 9,24 \mu\text{m}$ ; 5 napos tüszők átmérője:  $272,4 \pm 64,92 \mu\text{m}$ ; 11 napos tüszők átmérője  $830,4 \pm 172,8 \mu\text{m}$  (átlag  $\pm$  SD) volt. Az átmérőket páros t-próbával összehasonlítva szignifikáns, átlagosan 2,4×-es növekedést tapasztaltunk a harmadikról az ötödik napra (korrigált  $p$ -érték  $< 0,0001$ ; 95%-os szimultán konfidenciaintervallum [K.I.]: 1,8–3,1) . Az ötödikről a tizenegyedik napra bekövetkezett növekedést megvizsgálva is szignifikáns eredményt kaptunk (korrigált  $p$ -érték  $< 0,0001$ ). A tüszők átmérője ebben az időszakban átlagosan 3,2×-esére (95%-os szimultán K.I.: 2,3–4,3) nőtt (2. ábra).



**2. ÁBRA.** A preantrális tüszők növekedése *in vitro* ( $\log[\mu\text{m}]$ ) (A) Tüszőnövekedés az egyes mérési időpontokban; (B) az egyes tüszők növekedése az első méréstől (3. nap) a 11. napig. Somoskői és mtsai (2021) alapján [85]

**FIGURE 2.** In vitro growth of preantral follicles (A) *In vitro* growth in each sampling time; (B) in vitro growth of each follicles from the first sampling time (Day 3) to Day 11. Based on Somoskői et al. (2021) [85]

Összehasonlítottuk a friss és az OPS-vitrifikált minták felolvasztás utáni *in vitro* növekedését. Mindkét csoportban több, mint ötszörös kerületnövekedést tapasztaltunk a 0. naptól a 9. napig (3. ábra).



**3. ÁBRA.** A friss és az OPS-vitrifikált tüszők átlagos kerületének változása a tenyésztési időszak alatt (A) és (B) egy preantrális tüsző az IVC kezdetén, ill. egy antrális tüsző az IVC végén. BORDÁS és mtsai (2023) alapján [86]

**FIGURE 3.** Change in the mean perimeter of fresh and OPS-vitrified follicles during the culture period (A) and (B) represent a preantral follicle at the beginning of IVC, and an antrum-like cavity forming follicle at the end of IVC, respectively. Based on BORDÁS et al. (2023)[86]

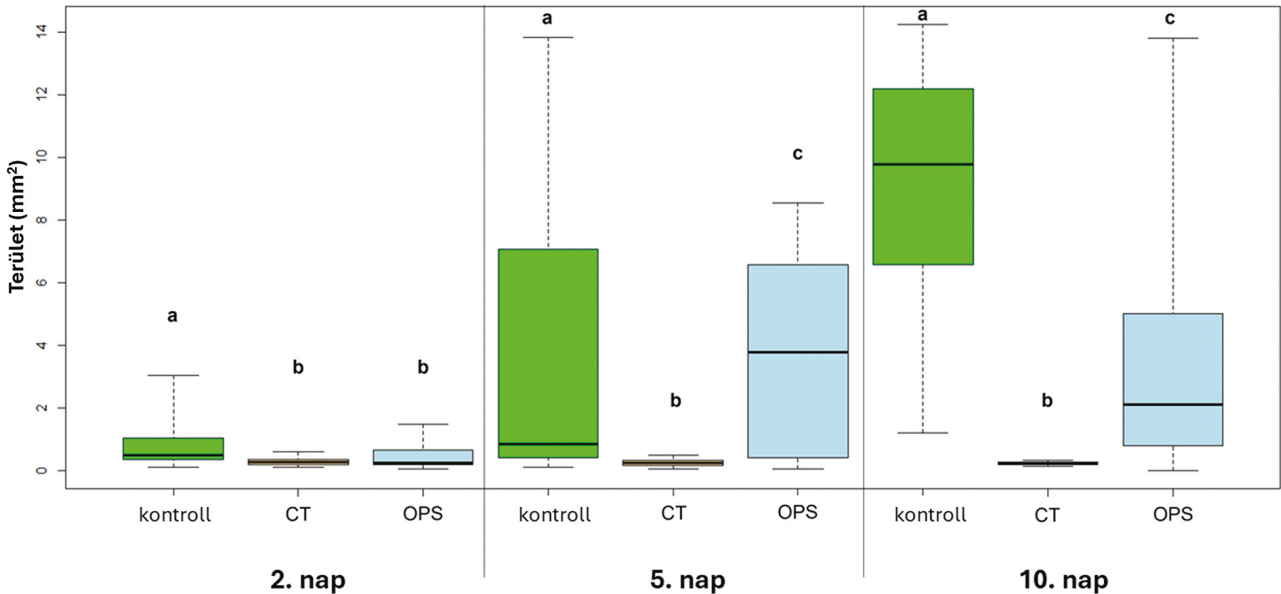
### Kutya

A 10 napos IVC alatt a tüszőnövekedésben a következő különbségeket figyeltük meg a kezelési csoportok között: a 2. napon a CT és az OPS csoportban a vitrifikált tüszők medián területe kisebb volt a friss tüszőkhöz képest (0,287 mm<sup>2</sup> [range: 0,1–0,61] [ $p < 0,005$ ] és 0,271 mm<sup>2</sup> [range: 0,07–1,5] [ $p < 0,05$ ], ill. 0,507 mm<sup>2</sup> [range: 0,12–3,04] a friss kontroll csoportban) (4. ábra). A vitrifikált tüszők medián területe (CT vs. OPS) azonban nem különbözött egymástól ( $p = 0,5$ ).

Az 5. napon az OPS módszerrel vitrifikált tüszők medián területe nagyobb volt a friss kontroll csoporthoz képest (3,79 [range: 0,1–8,5] vs. 0,86 mm<sup>2</sup> [range: 0,12–13,8],  $p < 0,001$ ), azonban az interkvartilis terjedelmek átfedik egymást (6,01 és 6,45). A CT csoport tüszőinek medián területe kisebb volt (0,25 mm<sup>2</sup> [range: 0,07–0,5]), mint az OPS (3,79 mm<sup>2</sup>) és a friss kontroll csoporté (0,86 mm<sup>2</sup>).

A 10. napon a friss kontroll csoport tüszőinek területe volt a legnagyobb (9,78 mm<sup>2</sup> [range: 1,2–14,2]), a vitrifikált (CT vs. OPS) tüszők medián területei között pedig szignifikáns különbség volt (0,24 mm<sup>2</sup> [range: 0,14–0,33] a CT és 2,11 mm<sup>2</sup> [range: 0,01–13,8] az OPS csoportokban) ( $p < 0,05$ ).

A csoportokon belüli területváltozásokat a következő táblázat foglalja össze (2. táblázat).



**4. ÁBRA.** A tüszőterületek mediánjának változása az egyes csoportokban az IVC-időszak alatt (a,b)  $p < 0,05$ , Kruskal–Wallis-teszt. Somoskői és mtsai (2023) alapján [87]

**FIGURE 4.** Changes in the median follicular area in each group during the IVC period (a,b)  $p < 0.05$ , Kruskal–Wallis test. Based on Somoskői et al (2023) [87]

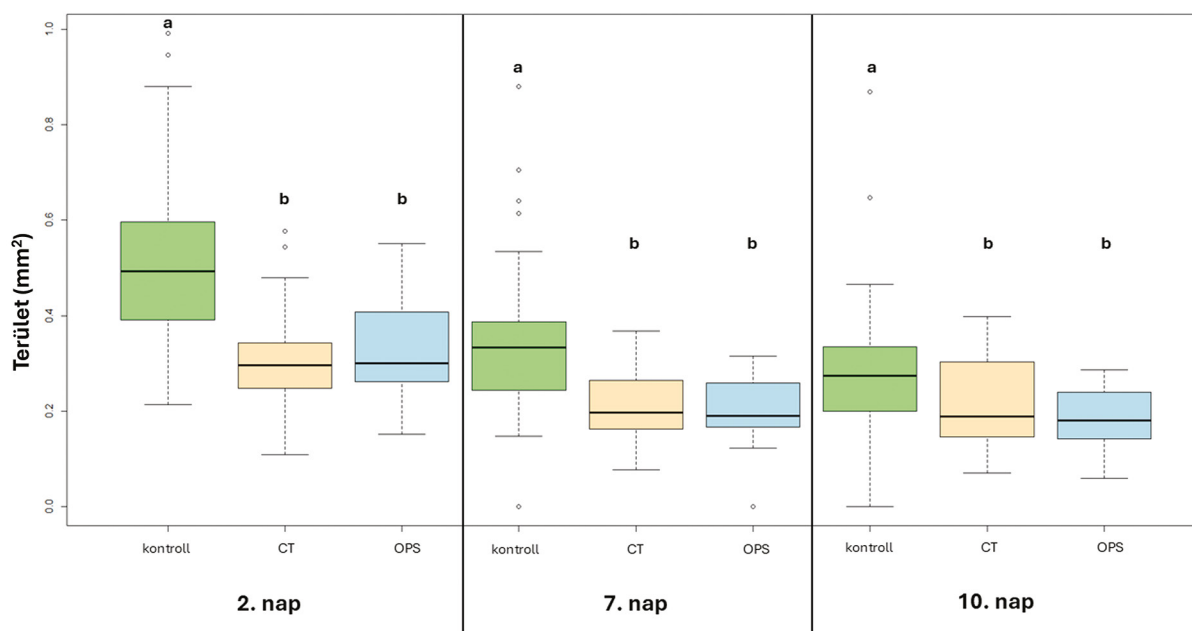
**2. TÁBLÁZAT.** Tüszőméretek változásai csoporton belül  
 $p < 0,05$ , Friedman-teszt, Wilcoxon post-hoc teszttel a páronkénti összehasonlításhoz

**TABLE 2.** Changes of the median follicular area within the different treatment groups  
P-values in *italics* indicate significant difference ( $p < 0.05$ ). Friedman test with post-hoc Wilcoxon rank sum test for pairwise comparison

| Kezelés          | Időintervallum | p-érték     | Változás  |
|------------------|----------------|-------------|-----------|
| Friss (kontroll) | Day 0–2        | $p < 0,001$ | növekedés |
|                  | Day 2–5        | $p < 0,001$ | növekedés |
|                  | Day 5–10       | $p < 0,01$  | növekedés |
| CT               | Day 0–2        | $p < 0,001$ | növekedés |
|                  | Day 2–5        | $p = 0,12$  | -         |
|                  | Day 5–10       | $p = 0,68$  | -         |
| OPS              | Day 0–2        | $p < 0,001$ | növekedés |
|                  | Day 2–5        | $p < 0,001$ | növekedés |
|                  | Day 5–10       | $p = 0,76$  | -         |

**Sertés**

Az *in vitro* tenyésztés 10 napos időszaka alatt a túlélési arány kisebb volt a CT csoportban (83,3%), mint a kontroll és az OPS csoportokban (97,4% és 94,4%).  
A 2. napon a CT és az OPS csoportban a vitrifikált tüszők területe kisebb volt a friss tüszőkhöz képest ( $0,314 \pm 0,12 \text{ mm}^2$  (átlag  $\pm$  SD) [ $p < 0,001$ ] és  $0,328 \pm 0,11 \text{ mm}^2$  [ $p < 0,001$ ], ill.  $0,512 \pm 0,18 \text{ mm}^2$  a friss kontroll csoportban). A vitrifikált tüszők területe (CT vs. OPS) azonban nem különbözött egymástól ( $p = 0.78$ ). (5. ábra)



**5. ÁBRA.** Sertés preantralis tüszők területének változása az egyes csoportokban az IVC-időszak alatt (a,b)  $p < 0.05$ , Kruskal–Wallis-teszt

**FIGURE 5.** Changes in the median follicular area in each group during the IVC period (a,b)  $p < 0.05$ , Kruskal–Wallis-test

A 7. napon a vitrifikált csoport (CT:  $0,21 \pm 0,08 \text{ mm}^2$  valamint OPS:  $0,2 \pm 0,07 \text{ mm}^2$ ) tüsző területei kisebbek voltak a friss kontroll csoporthoz képest ( $0,33 \pm 0,14 \text{ mm}^2$ ) [ $p < 0,001$ ]. Nem volt különbség azonban a vitrifikált csoportok (CT vs. OPS) között. ( $p = 0,69$ )

A 10. napon szintén csökkent a növekedés intenzitása a vitrifikált csoportokban (CT:  $0,215 \pm 0,09 \text{ mm}^2$  és OPS:  $0,177 \pm 0,07 \text{ mm}^2$ ) a kontroll csoporthoz képest ( $0,282 \pm 0,12 \text{ mm}^2$ ).

A csoportokon belüli területváltozásokat a következő táblázat foglalja össze (3. táblázat).

## ÖSZTRADIOLTERMELÉS

### Egér

A 3. és 5. napon mért E2-koncentrációk között nem találtunk különbséget, szemben az 5. és 7. napon mért E2-koncentrációkkal, ahol szignifikáns különbség adódott (átlagosan 1,68-szoros növekedés; korrigált p-érték  $< 0,01$ ; 95%-os szimultán K.I.: 0,79–2,58). A tüszők E2-termelése szignifikánsan nőtt az 5. napról a 11. napra, átlagosan 2,14-szeresére (korrigált p-érték = 0,003; 95%-os szimultán K.I.: 0,94–3,33). A 7. napot követően az egyes időpontok között nem találtunk szignifikáns különbséget (6. ábra).

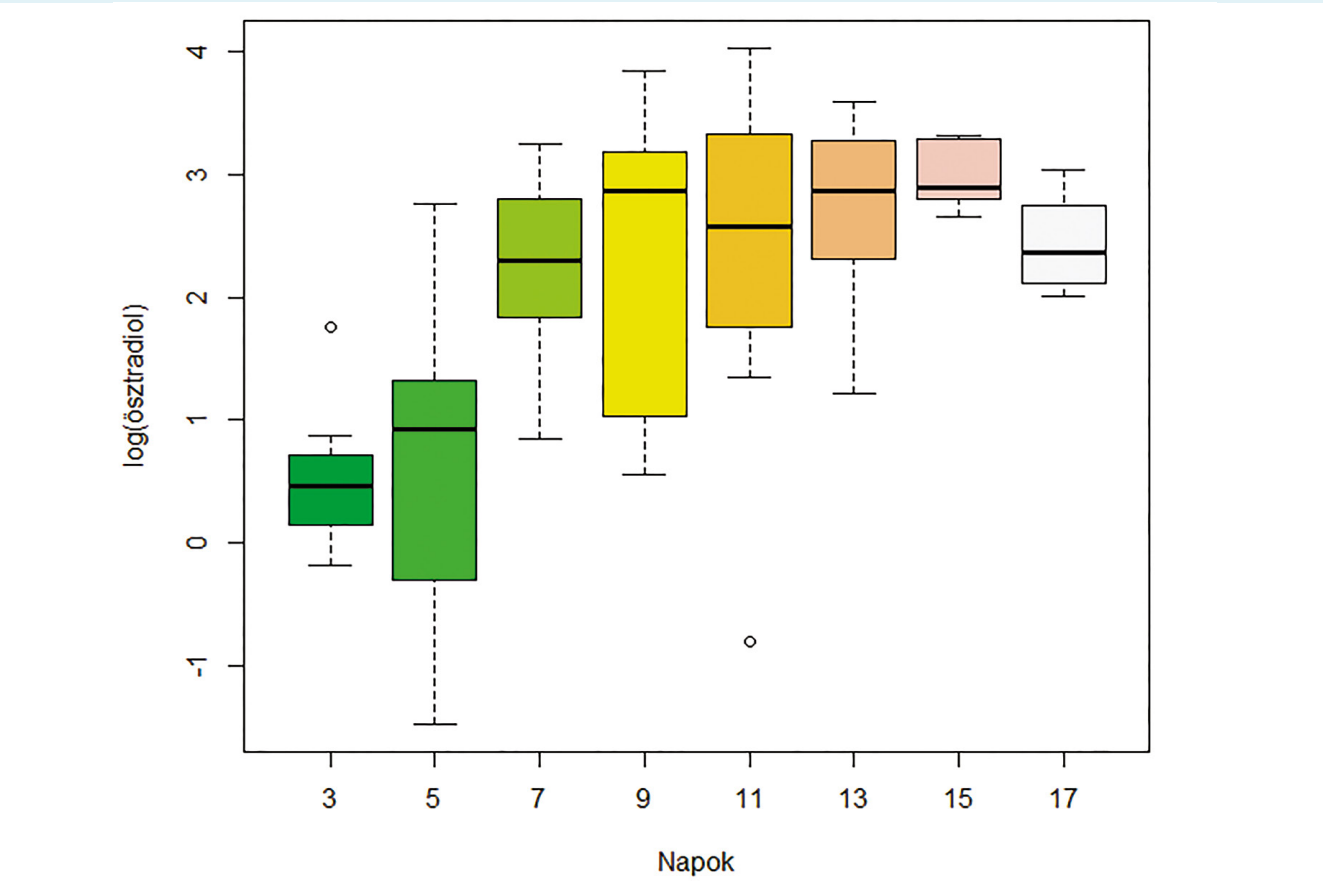
### Kutya

A 2. napon a friss kontroll csoport tüszői több ösztradiolt termeltek ( $41,58$  [range: 28,8–55,8] pg/ml), mint a CT és az OPS csoportok képletei ( $28,2$  [range: 16,1–48,7] pg/ml [ $p < 0,001$ ] és  $37,1$  [range: 15,4–45,7] pg/ml [ $p < 0,05$ ]). A vitrifikált tüszők E2-termelése azonban – a kezeléstől függetlenül – nem különbözött egymástól ( $p = 0,48$ ) (7. ábra).

**3. TÁBLÁZAT.** Sertéstüszőméretek változásai csoporton belül  
*p* < 0,05, Friedman teszt, Wilcoxon post-hoc teszttel a páronkénti összehasonlításhoz

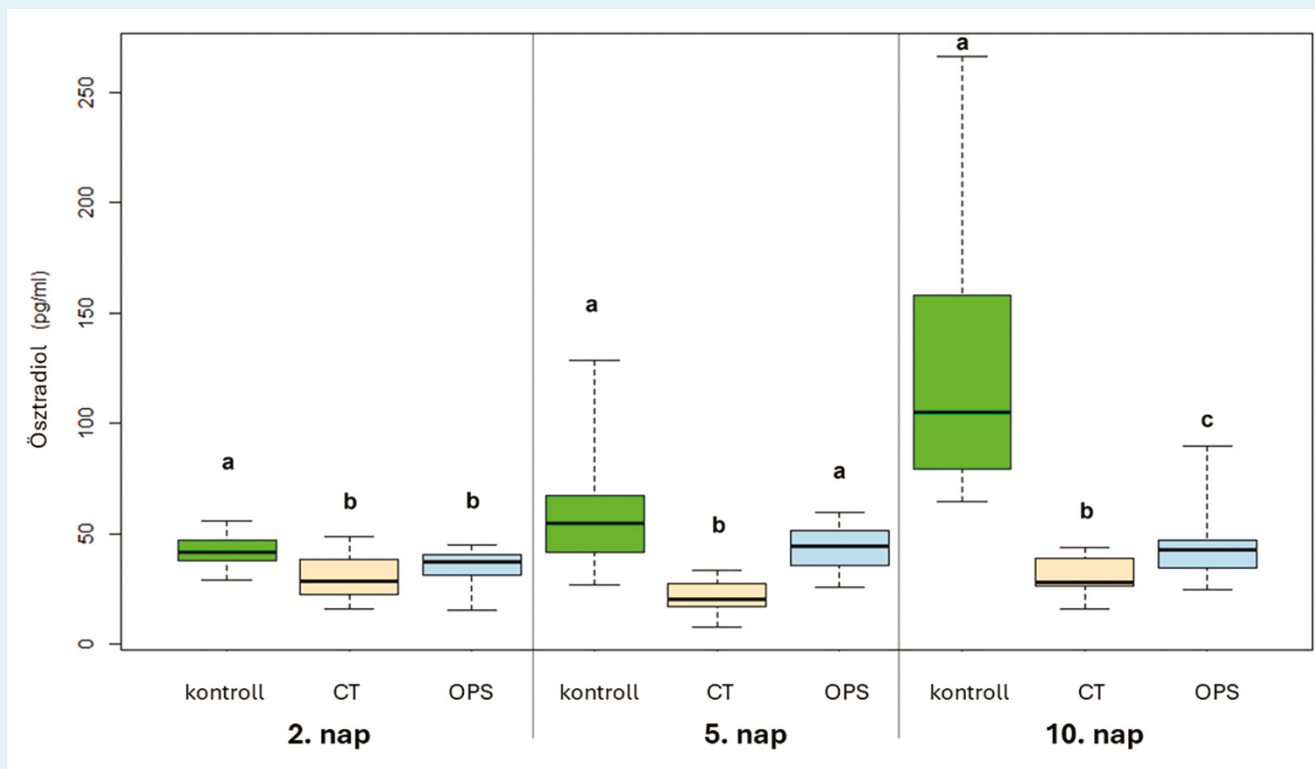
**TABLE 3.** Changes of the median follicular area within the different treatment groups in swine  
P-values in italics indicate significant difference (*p* < 0.05). Friedman test with post-hoc Wilcoxon rank sum test for pairwise comparison

| Kezelés             | Időintervallum | <i>p</i> -érték  | Változás    |
|---------------------|----------------|------------------|-------------|
| Friss<br>(kontroll) | D2-7           | <i>p</i> < 0,001 | csökkenés   |
|                     | D7-10          | <i>p</i> < 0,001 | csökkenés   |
|                     | D2-10          | <i>p</i> < 0,001 | csökkenés   |
| CT                  | D2-7           | <i>p</i> < 0,001 | csökkenés   |
|                     | D7-10          | <i>p</i> = 0,8   | -           |
|                     | D2-10          | <i>p</i> < 0,001 | - csökkenés |
| OPS                 | D2-7           | <i>p</i> < 0,001 | csökkenés   |
|                     | D7-10          | <i>p</i> < 0,05  | csökkenés   |
|                     | D2-10          | <i>p</i> < 0,001 | csökkenés   |



**6. ÁBRA.** A tápfolyadék E2-koncentrációjának (log[nM/l]) változása egérben  
Somoskői és mtsai (2021) alapján [85]

**FIGURE 6.** Changes of the E2 concentration in the culture medium (log[nM/l]) in mouse  
Based on Somoskői et al. (2021) [85]



**7. ÁBRA.** Ösztadiol-termelés változásai az egyes csoportokban az IVC-időszak alatt kutya preantralis tüszőkben (a,b)  $p < 0,05$ ; Somoskői és mtsai (2023) alapján [87]

**FIGURE 7.** Changes in the estradiol production in each group during the IVC period in canine PAFs (a,b)  $p < 0.05$ ; Based on Somoskői et al. (2023) [87]

Az 5. napon az E2-termelés kisebb volt a CT-vitrifikált csoportban (20,3 [range: 7,8–33,5] pg/ml) a friss kontrollhoz és az OPS csoporthoz képest: 54,7 [range: 26,9–128,7] és 44,37 [range: 25,6–59,5] pg/ml,  $p < 0,001$ ).

A 10. napon szignifikáns különbségek voltak az E2 termelés tekintetében a kezelési csoportok között (105,11 [range: 64,5–266,2], 27,9 [range: 16,1–48,7] és 42,4 [range: 24,8–89,6] pg/ml a friss kontroll, CT és OPS csoportban).

A legnagyobb mértékű E2-termelést a friss kontroll csoportban találtuk (26,9–266,2 pg/ml). A két vitrifikált csoportot összehasonlítva a CT csoportban kisebb ösztadiolkoncentráció-tartományt mértünk (7,8–48,7 pg/ml vs. 15,4–89,6 pg/ml, 7. ábra)

### Sertés

A 2. napon nem volt szignifikáns különbség a CT és a kontroll csoport E2-termelése között ( $22,42 \pm 6,6$  vs.  $22,69 \pm 4,6$  pg/ml, átlag  $\pm$  SD). Az OPS és a kontroll csoport között azonban ( $16,33 \pm 6,9$  vs.  $22,69 \pm 4,6$  pg/ml,  $p = 0,006$ ), valamint az OPS és a CT csoport között is szignifikáns eltérés volt ( $16,33 \pm 6,9$  vs.  $22,42 \pm 6,6$  pg/ml,  $p = 0,0088$ ).

A 7. napon nem volt különbség a csoportok között.

A 10. napon a CT és a kontroll csoport között szignifikáns különbséget mértünk ( $26,17 \pm 8,42$  vs.  $37,3 \pm 9,85$  pg/ml,  $p = 0,001$ ). Az OPS és a kontroll csoport között nem volt szignifikáns különbség, de az OPS és a CT csoport között szignifikáns eltérés volt ( $34,7 \pm 10,17$  vs.  $26,17 \pm 8,42$  pg/ml,  $p = 0,02$ ).

Az egyes kezelési csoportokban a különböző időintervallumokra vonatkozó változások és azok szignifikancia szintjei a következőképpen alakultak (4. táblázat).

**4. TÁBLÁZAT.** Sertés tüszők E2 termelésének változásai csoporton belül  
 $p < 0,05$ , Friedman teszt, Wilcoxon post-hoc tesztel a páronkénti összehasonlításhoz

**TABLE 4.** Changes of the estradiol production of PAFs within the different treatment groups in swine  
P-values in italics indicate significant difference ( $p < 0.05$ ). Friedman test with post-hoc Wilcoxon rank sum test for pairwise comparison

| Kezelés             | Időintervallum | <i>p</i> -érték | Változás  |
|---------------------|----------------|-----------------|-----------|
| Friss<br>(kontroll) | D2–7           | $p = 0,8$       | -         |
|                     | D7–10          | $p < 0,001$     | növekedés |
|                     | D2–10          | $p < 0,001$     | növekedés |
| CT                  | D2–7           | $p < 0,001$     | növekedés |
|                     | D7–10          | $p = 0,06$      | -         |
|                     | D2–10          | $p = 0,18$      | -         |
| OPS                 | D2–7           | $p < 0,001$     | növekedés |
|                     | D7–10          | $p = 0,13$      | -         |
|                     | D2–10          | $p < 0,001$     | növekedés |

A kontroll csoportban ösztradiolszint-növekedés volt megfigyelhető a 2–10., valamint a 7–10. nap között. Az OPS csoportban szintén növekedett az E2-szintje a kiindulási értékhez képest a 2–7. nap, valamint a 2–10. nap között, míg a CT csoportban nem volt változás az ösztradioltermelésben a 7. napot követően (8. ábra).

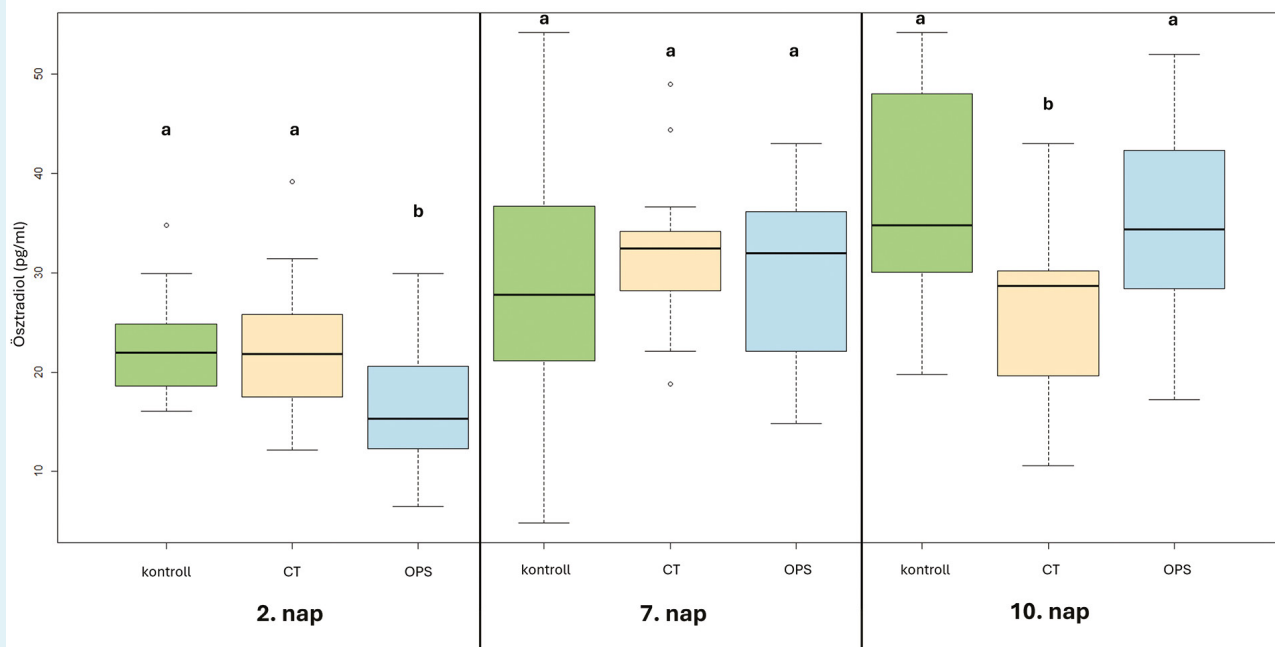
MEGVITATÁS

Jelen tanulmányban áttekintettük az eddigi (korábban már publikált) eredményeinket, amelyekben különböző mélyhűtési / krioprezerválási módszereknek (kriocső /CT/ és OPS vitrifikáció) az egér és kutya preantralis tüszők életképességére gyakorolt hatását vizsgáltuk és az így szerzett tapasztalatok alapján teszteltük a sertés preantralis tüszők felolvasztás utáni életképességét *in vitro* tenyésztéssel.

A PAF IVC ígéretes megközelítés a termékenység megőrzésében, ill. a génmegőrzésben. Számos kihívást kell azonban megoldani, mielőtt a technika a gyakorlatban is alkalmazható lenne. Minden fajnak megvannak a sajátosságai, amelyek befolyásolják az *in vitro* tenyésztés sikerességét és a kutatási eredmények alkalmazhatóságát. A tenyésztőrendszernek támogatnia kell a tüszők megfelelő struktúrájának és funkciójának megőrzését, és biztosítania kell a különböző tápanyagok, antioxidánsok, hormonok és növekedési faktorok jelenlétét optimális koncentrációban és kombinációban [75].

EGÉR

A preantralis tüszők mélyhűthetők lassú fagyasztással vagy vitrifikációval, azonban ezek hatékonysága eddig nem teljesen tisztázott. CARROLL (1990) kutatócsoportja számolt be az első sikeres kísérletről, amelyben izolált egér primer tüszőket fagyasztotta. Ebben a vizsgálatban az izolált tüszőket 0,25 ml-es műszalmákba gyűjtötték és programozott mélyhűtést alkalmaztak. A fagyasztás után felolvasztott tüszőket *in vitro* tenyésztettek, majd az érett pete-



**8. ÁBRA.** Ösztadioltermelés változásai az egyes csoportokban a 10 napos tenyésztési időszak alatt (a,b)  $p < 0,05$ , Kruskal–Wallis-teszt

**FIGURE 8.** Changes in the oestradiol production in each group during the 10-day IVC (a,b)  $p < 0.05$ , Kruskal–Wallis-test

**Az OPS-technika jól alkalmazható egér preantralis tüszők mélyhűtésére**

sejteket *in vitro* termékenyítették, az embriókat recipiens állatokba ültették és élő utódokat kaptak [76]. CORTVIDT (1996) kutatócsoportja szintén sikeresen krioprezervált izolált egér PAF-ot, amelyekből *in vitro* tenyésztéssel petesejteket gyűjtöttek. A petesejteket *in vitro* termékenyítették és az így előállított embriók növekedtek. Azonban ők is lassú fagyasztást alkalmaztak [19]. Klocke és mtsai (2015) humán petefészekszöveteket mélyhűtöttek és nem találtak különbséget a morfológiai integritás, az ösztadiolfelszabadulás, a tüszőfejlődés és az apoptotikus sejtek aránya tekintetében az *in vitro* tenyésztés során, összehasonlítva a lassú fagyasztást és a vitrifikációt [77]. Egy másik tanulmányban a szerzők nem találtak apoptózisra utaló jelet közvetlenül a felolvasztás után a vitrifikált egérpetefészkekben [78], de a lassan fagyasztott mintákban megnövekedett apoptózisarányt mértek [79]. Eredményeink azt mutatják, hogy az OPS-technika jól alkalmazható egér PAF-ok mélyhűtésére, ami megmutatkozik az így mélyhűtött minták nagy túlélési arányában is ( $81,5 \pm 15,32\%$ ). Eredményeink összhangban vannak XING és mtsainak adataival, akik patkány PAF-okat mélyhűtöttek OPS, SSV (solid surface vitrification), ill. programozott mélyhűtéssel (SF). Az OPS-fagyasztott tüszők 62,38%-os túlélést mutattak, ami szignifikánsan nagyobb volt, mint az SF csoport eredményei, ill. nem különbözött az SSV csoport értékeitől (64,76%) [80].

#### KUTYA

Tudomásunk szerint kutatócsoportunk végezte az első tanulmányt, amely a különböző módszerekkel krioprezervált, izolált kutya preantralis tüszők kriotoleranciáját és a felolvasztás utáni *in vitro* növekedését, ill. hormontermelését vizsgálja. Más fajokról azonban számos – de még mindig korlátozott – adat áll rendelkezésre.

zésre. Egy 2018-as tanulmányban NIKIFOROV és mtsai (2018) a lassú fagyasztás és 4 féle vitrifikációs technika izolált juhtüszőkre gyakorolt hatását vizsgálták [81]. A felolvasztott tüszőket 10 napig tenyésztették. Tapasztalataik szerint a kontroll csoport tüszőiben szignifikánsan nagyobb ösztadiolkoncentráció termelődött, mint a krioprezervált/vitrifikált csoportok tüszőiben. Eredményeink összhangban állnak velük, mivel a kontroll PAF-ok a 2., 5. és 10. napon több E2-t termeltek, mint a CT- vagy OPS-vitrifikált minták. Adataink a kontroll és OPS tüszők esetében az ösztadiolszint folyamatos emelkedését mutatják a 2. naptól a 10. napig, ami arra utal, hogy a granulosa sejtek hormontermelő funkciója megmaradt. A kriocső csoportban azonban a hormonszekréció stagnálást mutatott. Ez ellentétben NIKIFOROV és mtsai (2018) eredményeivel, ahol a juh tüszők a 6. napra érték el az ösztadioltermelésük csúcsát, majd a hormonkoncentráció minden kezelési csoportban csökkenni kezdett [81]. Eredményeink azt mutatják, hogy az OPS-ben vitrifikált tüszők az *in vitro* tenyésztési rendszerünkben képesek eljutni a tüszőfejlődés 10. napjáig.

### SERTÉS

A sertés preantrális tüszők *in vitro* tenyésztése, hasonlóan a kutyához, jelenleg még nagy kihívást jelent. A sertésben a tüszőérés időtartama az egérhez képest rendkívül hosszú [82], általában 80–100 napig tart. Ez a folyamat magában foglalja a tüszők növekedését és fejlődését a primordialis stádiumtól egészen az érett petesejtek ovulációjáig.

*In vivo* vizsgálatok kimutatták, hogy a korai antrális tüszőnek körülbelül 40 napra van szüksége ahhoz, hogy a preovulatorikus stádiumba fejlődjön [82]. Ez azt jelenti, hogy a nagyobb sertés preantrális tüszők tenyésztése több hetet is igénybe vehet, míg a kisebb preantrális tüszők tenyésztése hónapokat igényelhet a teljes érettség eléréséhez.

Mao és mtsai (2002) kísérleteikben azt figyelték meg, hogy a tüszőnövekedés mértéke a tenyésztés első 2 napja alatt nagyobb volt, míg a tenyésztés utolsó 2 napja alatt fokozatos csökkenést tapasztaltak az általuk használt TCM199, ill. NCSU23 tenyésztőoldatban (ami arra utal, hogy ezek a tenyésztési körülmények nem voltak ideálisak a hosszabb távú tüszőtenyésztés fenntartásához) [36]. Ez összhangban áll az általunk tapasztalt *in vitro* fejlődéssel, ami az első két napon intenzívebb volt a kontroll csoportban és a vitrifikált csoportokban is, azonban csökkenésnek indult a tenyésztés 7. napjától és tovább csökkent a 10. napig.

ROCHA és mtsai (2021) vizsgálatában csökkent a morfológiailag normális tüszők aránya ( $p < 0,05$ ) a 2. naptól a 4. napig, két tápoldat esetében is, azonban a tenyésztési időtől függetlenül mindkét médiumnál hasonló arányt tapasztaltak. Az antrumképződés százalékos aránya a 2. napon az  $\alpha$ -MEM-ben átlagosan nagyobb ( $p < 0,074$ ) volt, mint az NCSU23 oldatban. A tüszőnövekedés azonban nem különbözött ( $p > 0,05$ ) a vizsgált tápfolyadékok között. Továbbá mindkét tápfolyadék esetében a tüsző átmérője szignifikánsan nőtt a tenyésztés 0. napjától a 4. napig [28]. Az általunk használt tenyésztőrendszerben a tüszők 97,4%-a és 94,4%-a morfológiailag épek maradtak és túléltek a tenyésztés 10. napját a kontroll és az OPS csoportban, azonban kifejezett antrum és ovuláció nem volt detektálható.

WU és kutatócsoportja (2001) arról számolt be, hogy sertés preantrális tüszőkből nagy számmal sikerült antrális stádiumot elérniük, ha intakt preantrális tüszőket ép thecasejtekkel NCSU23 tápoldatban, 1,5 ng/ml FSH-val és 7,5% szérummal kiegészítve, hármassával tenyésztettek. Négy napos tenyésztés után ezekből a tüszőkből 68%-os eredménnyel cumulusos petesejtet nyertek, és a petesejtek 51%-a befejezte a meiotikus érést a metafázis II. stádiumig. Az érett petesejtek 53%-a termékenyült, a termékenyített petesejtek 43%-a osztódott, és 13%-a fejlődött a blasztociszta stádiumig [49].

Sertések és kutyák  
preantrális tüszőinek  
tenyésztése nagy  
kihívást jelent

DRIANCOURT és mtsai (1995) a gonadotropinok szerepét vizsgálták a sertések follikulogenezis-szabályozásában és kimutatták, hogy a 0,19–1,1 mm méretű tüszők növekedése gonadotropin-független, míg az 1,1–2 mm közötti növekedés FSH-függő, a 2 mm-nél nagyobb tüszők növekedése pedig LH-függő. Biokémiai szempontból, amikor a tüszőkben 2–3 réteg granulosa-sejt fejlődik, és a theca interna és externa sejtek differenciálódni kezdenek, sertésben a preantralis tüszők granulosa-sejtjein megjelennek az FSH-receptorok, így a tüszők gonadotropin-függővé válnak [83, 84]. Kísérletek kimutatták, hogy a preantralis tüszők képesek reagálni a növekvő mennyiségű FSH-ra, ami azt jelenti, hogy a tüszők tenyésztése hatékony és egyszerű megközelítést biztosít a korai tüszőszabályozás FSH általi tanulmányozására [36].

Wu kutatócsoportja (2007) egy másik kísérletben a tüszők ösztadiolszekréciját vizsgálták három tenyésztési csoportban: FSH-val, LH-val (30 ng/ml) és FSH-val kombináltan, ill. kezeletlen kontroll csoporttal. FSH- vagy LH- (30 ng/ml) kiegészítés nélkül a tüszők fokozatosan kisebb mennyiségű E2-t termeltek. Ezzel szemben az FSH- vagy LH+FSH- kiegészítéssel tenyésztett tüszők egyre nagyobb mennyiségben termeltek E2-t. Továbbá, a tenyésztés 2. és 3. napján az FSH-val ( $48,75 \pm 17$ ,  $70,5 \pm 14$  pg/ml) vagy LH-val + FSH-val ( $63,25 \pm 16$ ,  $72,5 \pm 12$  pg/ml) kiegészített médiumban tenyésztett tüszőkben az E2 mennyisége jelentősen nagyobb volt, mint a kontroll csoportban ( $16 \pm 10$ ,  $5,66 \pm 4$  pg/ml). Nem volt azonban szignifikáns különbség az FSH-val és az LH-val + FSH-val végzett tenyésztés E2 termelése között [71]. Kísérletünkben FSH-kiegészítést alkalmaztunk a tüszők *in vitro* tenyésztéséhez. Hasonlóképpen Wu és kutatócsoportjának (2007) eredményeihez a tüszők E2-termelése fokozatosan növekedett a kontroll és OPS csoportban. A CT csoportban azonban nem volt változás hormontermelésben a kiindulási értékhez képest. Ez arra enged következtetni, hogy a CT csoport tüszőit ért kriosérülés következtében a granulosa-sejtek hormontermelése megszűnt.

## KONKLÚZIÓ

**Az OPS, ill. a nyitott vitrifikációs rendszerek alkalmasak lehetnek nagy számú izolált follikulus egy időben történő mélyhűtésére**

Eddig csak néhány tanulmány foglalkozott az izolált PAF-ok krioprezerválására használt technikák összehasonlításával, és még kevesebb példát találunk olyan tanulmányokra, amelyek gyakorlati szempontból, az eszközök felől közelítik meg a kérdést. A fenti kísérletekben a mintákat a sejt kultúrák fagyasztására általánosan használt kriocsövekben és az embriológiában széles körben alkalmazott OPS-ben fagyasztottuk. A follikulusokon tapasztalt eredmények alapján az OPS (és ezzel együtt a nyitott vitrifikációs rendszerek) alkalmas lehet nagy számú izolált follikulus egy időben történő mélyhűtésére. A technika megfelelő életképességet biztosít a felolvasztás utáni rövid távú *in vitro* tenyésztéshez. A továbbiakban kutatócsoportunk célul tűzte ki az IVC-rendszer finomítását, ezáltal a hosszútávú tenyésztés megalapozását. Az így nyert eredmények hozzájárulnak nemcsak a génmegőrzési módszerek fejlesztéséhez, de a tüszőnövekedéssel kapcsolatos ismereteink bővítéséhez is, különös tekintettel a fajok közötti különbségekre.

## KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Az FK\_134887 számú projekt a Nemzeti Kutatási Fejlesztési és Innovációs Alapból biztosított támogatással, a „Fiatal kutatói kiválósági program (FK\_20)” pályázati program finanszírozásában valósult meg.

A közlemény a Bolyai János Kutatási Ösztöndíj támogatásával jött létre (BO/00399/24/4)

A TKP2020-NKA-01 számú projekt a Nemzeti Kutatási Fejlesztési és Innovációs Alapból biztosított támogatással, a Tématerületi Kiválósági Program 2020 (2020-4.1.1-TKP2020) pályázati program finanszírozásában valósult meg.

A tanulmányt az Állatorvostudományi Egyetem tudományos kutatási alapja támogatta (SRF-002 számú pályázat).

A kutatást támogatta az Állatorvostudományi Egyetem Stratégiai Kutatási Alapja (SRF-001 számú pályázat).

A Szerzők ezúton szeretnék megköszönni DR. MÜLLER LINDÁNAK és DR. RÁTKY JÓZSEFNEK, ill. a Szülészeti Klinika (Kisállatklinika) mtsainak a mintagyűjtés során nyújtott segítségét.

## IRODALOM

- Luvoni GC, Colombo M (2020) Cold case: Small animal gametes cryobanking. *Theriogenology* 150:445–451. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2020.02.047>
- The ESHRE Guideline Group on Female Fertility Preservation, Anderson RA, Amant F, Braat D, D'Angelo A, Chuva de Sousa Lopes SM, Demeestere I, Dwek S, Frith L, Lambertini M, Maslin C, Moura-Ramos M, Nogueira D, Rodriguez-Wallberg K, Vermeulen N (2020) ESHRE guideline: female fertility preservation†. *Human Reproduction Open* 2020:hoaa052. <https://doi.org/10.1093/hropen/hoaa052>
- Pukazhenthi B, Comizzoli P, Travis AJ, Wildt DE (2006) Applications of emerging technologies to the study and conservation of threatened and endangered species. *Reprod Fertil Dev* 18:77. <https://doi.org/10.1071/RD05117>
- Herrick JR (2019) Assisted reproductive technologies for endangered species conservation: developing sophisticated protocols with limited access to animals with unique reproductive mechanisms. *Biol Reprod* 100:1158–1170. <https://doi.org/10.1093/biolre/ioz025>
- Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture (2012) Cryoconservation of animal genetic resources. FAO, Rome
- Temerario L, Monaco D, Mastroiocco A, Martino NA, Cseh S, Lacalandra GM, Ciani E, Dell'Aquila ME (2023) New Strategies for Conservation of Gentile di Puglia Sheep Breed, an Autochthonous Capital of Millennial Tradition in Southern Italy. *Animals* 13:2371. <https://doi.org/10.3390/ani13142371>
- Jivago JLPR, Paulini F, Silva RC, Araujo MS, Marinho APS, Lucci CM (2018) Cryopreservation and characterization of canine preantral follicles. *Cryobiology* 81:34–42. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2018.02.013>
- Hariya M, Suzuki H (2016) Incidence of Apoptotic Cells After Vitrification in Canine Ovarian Tissues. *Journal of Mammalian Ova Research* 33:69–75. <https://doi.org/10.1274/jmor.33.69>
- Hirayama Y, Inoue K, Suzuki H (2011) Effect of Intraperitoneal Administration of Desialylated Erythropoietin on the Follicular Survival in Cryopreserved Canine Ovaries after Xenotransplantation. *Journal of Mammalian Ova Research* 28:143–147. <https://doi.org/10.1274/jmor.28.143>
- Ishijima T, Abe Y, Suzuki H (2009) Follicular Loss of the Cryopreserved Canine Ovary after Xenotransplantation. *jmor* 26:61–65. <https://doi.org/10.1274/jmor.26.61>
- Ishijima T, Kobayashi Y, Lee D-S, Ueta YY, Matsui M, Lee J-Y, Suwa Y, Miyahara K, Suzuki H (2006) Cryopreservation of Canine Ovaries by Vitrification. *J Reprod Dev* 52:293–299. <https://doi.org/10.1262/jrd.17080>
- Suzuki H, Ishijima T, Maruyama S, Yanagimoto Ueta Y, Abe Y, Saitoh H (2008) Beneficial effect of desialylated erythropoietin administration on the frozen-thawed canine ovarian xenotransplantation. *J Assist Reprod Genet* 25:571–575. <https://doi.org/10.1007/s10815-008-9271-9>
- Bacsa M, Török D, Bakony M, Somoskői B, Müller L, Keresztes Z, Bordás L, Cseh S (2024) Kutyasperma mélyhűtése, fagyasztóoldatokkal végzett összehasonlító vizsgálatok előzetes eredményei. Dog semen freezing: preliminary results of comparative studies with different freezing extenders. *Magy Állatorvosok Lapja* 146:589–602. <https://doi.org/10.56385/magyallorv.2024.10.589-602>
- Donnez J, Dolmans MM, Demylle D, Jadoul P, Pirard C, Squifflet J, Martinez-Madrid B, van Langendonck A (2004) Livebirth after orthotopic transplantation of cryopreserved ovarian tissue. *Lancet* 364:1405–1410. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(04\)17222-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(04)17222-X)
- Takae S, Suzuki N (2019) Current state and future possibilities of ovarian tissue transplantation. *Reprod Med Biol* 18:217–224. <https://doi.org/10.1002/rmb2.12268>
- Grynberg M, Poulain M, Sebag-Peyrelevade S, le Parco S, Fanchin R, Frydman N (2012) Ovarian tissue and follicle transplantation as an option for fertility preservation. *Fertil Steril* 97:1260–1268. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2012.04.042>
- Ganji R, Nabiuni M, Faraji R (2015) Development of mouse preantral follicle after in vitro culture in a medium containing melatonin. *Cell J* 16:546–553. <https://doi.org/10.22074/cellj.2015.499>
- Gosden RG (2002) Current perspective on primordial follicle cryopreservation and culture for reproductive medicine. *Hum Reprod Update* 8:105–110. <https://doi.org/10.1093/humupd/8.2.105>
- Cortvrindt R, Smits J, Van Steirteghem AC (1996) Ovary and ovulation: In-vitro maturation, fertilization and embryo development of immature oocytes from early preantral follicles from prepubertal mice in a simplified culture system. *Hum Reprod* 11:2656–2666. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.humrep.a019188>
- Hovatta O (2005) Methods for cryopreservation of human ovarian tissue. *Reprod Biomed Online* 10:729–734. [https://doi.org/10.1016/s1472-6483\(10\)61116-9](https://doi.org/10.1016/s1472-6483(10)61116-9)

21. Shaw JM, Oranratnachai A, Trounson AO (2000) Fundamental cryobiology of mammalian oocytes and ovarian tissue. *Theriogenology* 53:59–72. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(99\)00240-x](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(99)00240-x)
22. Amorim CA, Jacobs S, Devireddy RV, Van Langendonck A, Vanacker J, Jaeger J, Luyckx V, Donnez J, Dolmans M-M (2013) Successful vitrification and autografting of baboon (*Papio anubis*) ovarian tissue. *Hum Reprod* 28:2146–2156. <https://doi.org/10.1093/humrep/det103>
23. Gupta PSP, Johnson P, Kaushik K, Krishna K, Nandi S, Mondal S, Nikhil Kumar Tej J, Somoskői B, Cseh S (2021) Effect of retinol as antioxidant on the post-thaw viability and the expression of apoptosis and developmental competence-related genes of vitrified preantral follicles in buffalo (*Bubalus bubalis*). *Reprod Domest Anim* 56:1446–1455
24. Konc J, Kanyó K, Kriston R, Somoskői B, Cseh S (2014) Cryopreservation of Embryos and Oocytes in Human Assisted Reproduction. *BioMed Res Int* 2014:307268. <https://doi.org/10.1155/2014/307268>
25. Demirel MA, Acar DB, Ekim B, Çelikkan FT, Alkan KK, Salar S, Erdemli EA, Özkavukçu S, Yar SS, Kanca H, Baştan A (2018) The evaluation of xenotransplantation of feline ovarian tissue vitrified by needle immersed vitrification technique into male immunodeficient mice. *Cell Tissue Bank* 19:133–147. <https://doi.org/10.1007/s10561-017-9663-0>
26. Abedelahi A, Rezaei-Tavirani M, Mohammadnejad D (2013) Fertility Preservation Among the Cancer Patients by Ovarian Tissue Cryopreservation, Transplantation, and Follicular Development. *Iran J Cancer Prev* 6:123–132
27. Camboni A, Martinez-Madrid B, Dolmans M-M, Amorim CA, Nottola SA, Donnez J, Van Langendonck A (2008) Preservation of fertility in young cancer patients: contribution of transmission electron microscopy. *Reproductive BioMedicine Online* 17:136–150. [https://doi.org/10.1016/S1472-6483\(10\)60303-3](https://doi.org/10.1016/S1472-6483(10)60303-3)
28. Rocha RMP, Rubessa M, Lima LF de, Silva AFB da, Winters R, Polkoff K, Milner D, Campello CC, Figueiredo JR de, Wheeler M (2021) Effect of base media, FSH and anti-Müllerian hormone (AMH) alone or in combination on the growth of pig preantral follicles in vitro. *Research, Society and Development* 10:e53101522488–e53101522488. <https://doi.org/10.33448/rsd-v10i15.22488>
29. Baker SJ, Spears N (1997) Follicle stimulating hormone inhibits apoptosis in pre- and early-antral murine follicles in vitro. *J Reprod Fertil* 40:19–21
30. Roche JF, O’Callaghan D (1987) Follicular Growth and Ovulation Rate in Farm Animals. Springer Science & Business Media
31. Gosden RG, Boland NI, Spears N, Murray AA, Chapman M, Wade JC, Zohdy NI, Brown N (1993) The biology and technology of follicular oocyte development in vitro. *Reproductive Medicine Review* 2:129–152. <https://doi.org/10.1017/S0962279900000685>
32. Hsueh A, Billig H, Tsafiriri A (1994) Ovarian Follicle Atresia: A Hormonally Controlled Apoptotic Process\*. *Endocr Rev* 15:707–724. <https://doi.org/10.1210/edrv-15-6-707>
33. Roy SK, Treacy BJ (1993) Isolation and long-term culture of human preantral follicles\*. *Fertil Steril* 59:783–790. [https://doi.org/10.1016/S0015-0282\(16\)55860-9](https://doi.org/10.1016/S0015-0282(16)55860-9)
34. Chun SY, Billig H, Tilly JL, Furuta I, Tsafiriri A, Hsueh AJ (1994) Gonadotropin suppression of apoptosis in cultured preovulatory follicles: mediatory role of endogenous insulin-like growth factor I. *Endocrinology* 135:1845–1853. <https://doi.org/10.1210/endo.135.5.7525255>
35. Chun SY, Eisenhauer KM, Minami S, Billig H, Perlas E, Hsueh AJ (1996) Hormonal regulation of apoptosis in early antral follicles: follicle-stimulating hormone as a major survival factor. *Endocrinology* 137:1447–1456. <https://doi.org/10.1210/endo.137.4.8625923>
36. Mao J, Wu G, Smith MF, McCauley TC, Cantley TC, Prather RS, Didion BA, Day BN (2002) Effects of Culture Medium, Serum Type, and Various Concentrations of Follicle-Stimulating Hormone on Porcine Preantral Follicular Development and Antrum Formation In Vitro<sup>1</sup>. *Biol Reprod* 67:1197–1203. <https://doi.org/10.1095/biolreprod67.4.1197>
37. Eppig JJ, Schroeder AC (1989) Capacity of Mouse Oocytes from Preantral Follicles to Undergo Embryogenesis and Development to Live Young after Growth, Maturation, and Fertilization In Vitro<sup>1</sup>. *Biol Reprod* 41:268–276. <https://doi.org/10.1095/biolreprod41.2.268>
38. Cain L, Chatterjee S, Collins TJ (1995) In vitro folliculogenesis of rat preantral follicles. *Endocrinology* 136:3369–3377. <https://doi.org/10.1210/endo.136.8.7628372>
39. Roy SK, Greenwald GS (1985) An Enzymatic Method for Dissociation of Intact Follicles from the Hamster Ovary: Histological and Quantitative Aspects. *Biol Reprod* 32:203–215. <https://doi.org/10.1095/biolreprod32.1.203>
40. 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. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.1000333>
41. Saha S, Shimizu M, Geshi M, Izaike Y (2000) In vitro culture of bovine preantral follicles. *Anim Reprod Sci* 63:27–39. [https://doi.org/10.1016/S0378-4320\(00\)00162-7](https://doi.org/10.1016/S0378-4320(00)00162-7)
42. Wandji S-A, Sršen V, Voss AK, Eppig JJ, Fortune JE (1996) Initiation in Vitro of Growth of Bovine Primordial Follicles<sup>1</sup>. *Biol Reprod* 55:942–948. <https://doi.org/10.1095/biolreprod55.5.942>
43. Abir R, Franks S, Mobberley MA, Moore PA, Margara RA, Winston RML (1997) Mechanical isolation and in vitro growth of pre-antral and small antral human follicles. *Fertil Steril* 68:682–688. [https://doi.org/10.1016/S0015-0282\(97\)00264-1](https://doi.org/10.1016/S0015-0282(97)00264-1)
44. Qvist R, Blackwell LF, Bourne H, Brown JB (1990) Development of mouse ovarian follicles from primary to preovulatory stages in vitro. *J Reprod Fertil* 89:169–180. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0890169>
45. Nayudu PL, Osborn SM (1992) Factors influencing the rate of preantral and antral growth of mouse ovarian follicles in vitro. *J Reprod Fertil* 95:349–362. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0950349>
46. Figueiredo JR, Hulshof SCJ, Van den Hurk R, Nussgens B, Bevers MM, Ectors FJ, Beckers JF (1994) Preservation of oocyte and granulosa cell morphology in bovine preantral follicles cultured in vitro. *Theriogenology* 41:1333–1346. [https://doi.org/10.1016/0093-691X\(94\)90492-2](https://doi.org/10.1016/0093-691X(94)90492-2)
47. Cecconi S, Barboni B, Coccia M, Mattioli M (1999) In Vitro Development of Sheep Preantral Follicles<sup>1</sup>. *Biol Reprod* 60:594–601. <https://doi.org/10.1095/biolreprod60.3.594>
48. Amorim CA, Lucci CM, Rodrigues APR, Carvalho FCA, Figueiredo JR, Rondina D, Cecchi R, Giorgetti A, Martini A, Gonçalves PBD (2000) Quantitative and qualitative analysis of the effectiveness of a mechanical method for the isolation of preantral follicles from ovine ovaries. *Theriogenology* 53:1251–1262. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(00\)00269-7](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(00)00269-7)
49. Wu J, Emery BR, Carrell DT (2001) In Vitro Growth, Maturation, Fertilization, and Embryonic Development of Oocytes from Porcine Preantral Follicles. *Biol Reprod* 64:375–381. <https://doi.org/10.1095/biolreprod64.1.375>

50. Green LJ, Shikanov A (2016) *In vitro* culture methods of preantral follicles. *Theriogenology* 86:229–238. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.04.036>
51. West ER, Xu M, Woodruff TK, Shea LD (2007) Physical properties of alginate hydrogels and their effects on *in vitro* follicle development. *Biomaterials* 28:4439–4448. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2007.07.001>
52. Teng Z, Wang C, Wang Y, Huang K, Xiang X, Niu W, Feng L, Zhao L, Yan H, Zhang H (2016) Gap junctions are essential for murine primordial follicle assembly immediately before birth. *Reproduction* 151:105–115. <https://doi.org/10.1530/REP-15-0282>
53. Filatov MA, Khranova YV, Semenova ML (2015) *In vitro* mouse ovarian follicle growth and maturation in alginate hydrogel: current State of the art. *Acta Naturae (англоязычная версия)* 7:48–56
54. Brito IR, Silva CMG, Duarte ABG, Lima IMT, Rodrigues GQ, Rossetto R, Sales AD, Lobo CH, Bernuci MP, Rosa-E-Silva ACJS, Campello CC, Xu M, Figueiredo JR (2014) Alginate hydrogel matrix stiffness influences the *in vitro* development of caprine preantral follicles. *Mol Reprod Dev* 81:636–645. <https://doi.org/10.1002/mrd.22330>
55. Eppig JJ, O'Brien MJ (1996) Development *in vitro* of mouse oocytes from primordial follicles. *Biol reprod* 54:197–207. <https://doi.org/10.1095/biolreprod54.1.197>
56. Liu H-C, He Z, Rosenwaks Z (2002) *In vitro* culture and *in vitro* maturation of mouse preantral follicles with recombinant gonadotropins. *Fertil steril* 77:373–383. [https://doi.org/10.1016/S0015-0282\(01\)02977-6](https://doi.org/10.1016/S0015-0282(01)02977-6)
57. Reynaud K, Saint-Dizier M, A F, Thoumire S, Chastant-Maillard S (2020) Follicle growth, oocyte maturation, embryo development, and reproductive biotechnologies in dog and cat. *Clinical Theriogenology* 12:189–203
58. Andersen AC, Simpson ME (1973) The ovary and reproductive cycle of the dog (Beagle). *Theriogenology* 1:39–42. [https://doi.org/10.1016/0093-691X\(74\)90062-4](https://doi.org/10.1016/0093-691X(74)90062-4)
59. Durrant BS, Pratt NC, Russ KD, Bolamba D (1998) Isolation and characterization of canine advanced preantral and early antral follicles. *Theriogenology* 49:917–932. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(98\)00041-7](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(98)00041-7)
60. McDougall K, Hay MA, Goodrowe KL, Gartley CJ, King WA (1997) Changes in the number of follicles and of oocytes in ovaries of prepubertal, peripubertal and mature bitches. *J Reprod Fertil Suppl* 51:25–31
61. Reynaud K, de Leseqno CV, Chebrou M, Thoumire S, Chastant-Maillard S (2009) Follicle population, cumulus mucification, and oocyte chromatin configuration during the periovulatory period in the female dog. *Theriogenology* 72:1120–1131. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2009.07.006>
62. Saint-Dizier M, Jaffré N, Reynaud K, Remy B, Thoumire S, Chastant-Maillard S (2008) Expression of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone binding sites in the bitch ovary during the follicular phase. *Reprod Fertil Dev* 20:925–934. <https://doi.org/10.1071/RD08119>
63. de Leseqno CV, Reynaud K, Pechoux C, Thoumire S, Chastant-Maillard S (2008) Ultrastructure of canine oocytes during *in vivo* maturation. *Mol Reprod Dev* 75:115–125. <https://doi.org/10.1002/mrd.20763>
64. Yamada S, Shimazu Y, Kawano Y, Nakazawa M, Naito K, Toyoda Y (1993) *In vitro* maturation and fertilization of preovulatory dog oocytes. *J Reprod Fertil Suppl* 47:227–229
65. Nagashima JB, Wildt DE, Travis AJ, Songsasen N (2019) Activin promotes growth and antral cavity expansion in the dog ovarian follicle. *Theriogenology* 129:168–177. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2019.02.018>
66. Nagashima JB, Songsasen N (2021) Canid Reproductive Biology: Norm and Unique Aspects in Strategies and Mechanisms. *Animals* 11:653. <https://doi.org/10.3390/ani11030653>
67. Borges EN, Silva RC, Futino DO, Rocha-Junior CMC, Amorim CA, Báo SN, Lucci CM (2009) Cryopreservation of swine ovarian tissue: Effect of different cryoprotectants on the structural preservation of preantral follicle oocytes. *Cryobiology* 59:195–200. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2009.07.003>
68. Didion B, Pomp D, Martin M, Homanics G, Markert C (1990) Observation on the cooling and cryopreservation of pig oocytes at the germinal vesicle stage. *J anim sci* 68:2803–2810. <https://doi.org/10.2527/1990.6892803x>
69. Somfai T, Ozawa M, Noguchi J, Kaneko H, Kuriani Karja NW, Farhudin M, Dinnyés A, Nagai T, Kikuchi K (2007) Developmental competence of *in vitro*-fertilized porcine oocytes after *in vitro* maturation and solid surface vitrification: Effect of cryopreservation on oocyte antioxidative system and cell cycle stage. *Cryobiology* 55:115–126. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2007.06.008>
70. Mao J, Smith MF, Rucker EB, Wu GM, McCauley TC, Cantley TC, Prather RS, Didion BA, Day BN (2004) Effect of epidermal growth factor and insulin-like growth factor I on porcine preantral follicular growth, antrum formation, and stimulation of granulosa cell proliferation and suppression of apoptosis *in vitro* 1. *J Anim Sci* 82:1967–1975. <https://doi.org/10.2527/2004.8271967x>
71. Wu J, Xu B, Wang W (2007) Effects of luteinizing hormone and follicle stimulating hormone on the developmental competence of porcine preantral follicle oocytes grown *in vitro*. *J Assist Reprod Genet* 24:419–424. <https://doi.org/10.1007/s10815-007-9154-5>
72. Tasaki H, Iwata H, Sato D, Monji Y, Kuwayama T (2013) Estradiol has a major role in antrum formation of porcine preantral follicles cultured *in vitro*. *Theriogenology* 79:809–814. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2012.12.009>
73. Lima LF de, Rubessa M, Rocha RM, Winters R, Milner DJ, Campello CC, Figueiredo JR, Wheeler MB (2018) High diluted and dynamised follicle stimulating hormone modulates steroid production in isolated porcine preantral follicles cultured *in vitro*. *Homeopathy* 106:87–92. <https://doi.org/10.1016/j.homp.2017.03.004>
74. Cao Z, Gao D, Tong X, Xu T, Zhang D, Wang Y, Liu Y, Li Y, Zhang Y, Pu Y (2019) Melatonin improves developmental competence of oocyte-granulosa cell complexes from porcine preantral follicles. *Theriogenology* 133:149–158. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2019.05.003>
75. Le BAM, Nguyen LBL, Lam DTP, Lam CT, Nguyen N-T, Nguyen VT, Bui H-T (2024) Agarose-based 3D culture improved the developmental competence of oocyte-granulosa complex isolated from porcine preantral follicle. *Theriogenology* 223:11–21. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2024.04.010>
76. Carroll J, Whittingham DG, Wood MJ, Telfer E, Gosden RG (1990) Extra-ovarian production of mature viable mouse oocytes from frozen primary follicles. *J Reprod Fertil* 90:321–327. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0900321>
77. Klocke S, Bündgen N, Köster F, Eichenlaub-Ritter U, Griesinger G (2015) Slow-freezing versus vitrification for human ovarian tissue cryopreservation. *Arch Gynecol Obstet* 291:419–426

78. Mazoochi T, Salehnia M, Valojerdi MR, Mowla SJ (2008) Morphologic, ultrastructural, and biochemical identification of apoptosis in vitrified-warmed mouse ovarian tissue. *Fertil Steril* 90:1480–1486. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2007.07.1384>
79. Tirelli M, Basini G, Grasselli F, Bianco F, Tamanini C (2005) Cryopreservation of pig granulosa cells: effect of FSH addition to freezing medium. *Domest Anim Endocrinol* 28:17–33. <https://doi.org/10.1016/j.domaniend.2004.05.007>
80. Xing W, Zhou C, Bian J, Montag M, Xu Y, Li Y, Li T (2010) Solid-surface vitrification is an appropriate and convenient method for cryopreservation of isolated rat follicles. *Reprod Biol Endocrinol* 8:1–9. <https://doi.org/10.1186/1477-7827-8-42>
81. Nikiforov D, Russo V, Nardinocchi D, Bernabò N, Mattioli M, Barboni B (2018) Innovative multi-protectoral approach increases survival rate after vitrification of ovarian tissue and isolated follicles with improved results in comparison with conventional method. *J Ovarian Res* 11:65. <https://doi.org/10.1186/s13048-018-0437-5>
82. Morbeck DE, Esbenshade KL, Flowers WL, Britt JH (1992) Kinetics of Follicle Growth in the Prepubertal Gilt. *Biol Reprod* 47:485–491. <https://doi.org/10.1095/biolreprod47.3.485>
83. Nakano R, Akahori T, Katayama K, Tojo S (1977) Binding of LH and FSH to porcine granulosa cells during follicular maturation. *J Reprod Fertil* 51:23–27. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0510023>
84. Yuan W, Lucy MC, Smith MF (1996) Messenger Ribonucleic Acid for Insulin-Like Growth Factors-I and -II, Insulin-Like Growth Factor-Binding Protein-2, Gonadotropin Receptors, and Steroidogenic Enzymes in Porcine Follicles1. *Biol Reprod* 55:1045–1054. <https://doi.org/10.1095/biolreprod55.5.1045>
85. Somoskői B, Bordás L, Török D, Gupta PSP, Mondal S, Nandi S, Cseh S (2021) Egér preantralis tüszők izolálása, in vitro tenyésztése és mélyhűtése vitrifikációs technikával-elozetes eredmények. *Magy Állatorvosok Lapja* 143:225–234
86. Bordás L, Somoskői B, Török D, Vincze BN, Cseh S (2023) Post-thaw viability of mouse preantral follicles after cryopreservation with cryotube freezing and OPS vitrification procedures. *Reprod Biol* 23:100752. <https://doi.org/10.1016/j.repbio.2023.100752>
87. Somoskői B, Bordás L, Uno F, Kispál D, Müller L, Török D, Cseh S (2023) Effects of different cryopreservation methods on canine isolated preantral follicles. *Anim Reprod Sci* 258:107361. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2023.107361>

Közlésre érke.: 2024. okt. 16.