

MANGALICA PETESEJTEK ÉS EMBRIÓK KRIOPREZERVÁCIÓJA

VARGA ERIKA – EGRSZEGI ISTVÁN – RÁTKY JÓZSEF – TEMPFLI KÁROLY – PATAKI RENÁTA –
BALI PAPP ÁGNES

ÖSSZEFOGLALÁS

Az *in vitro* embrió-előállítás napjainkra több faj esetében rutin eljárássá vált, sertés fajban azonban további alap kutatásokra van szükség a módszer széles körű gyakorlati alkalmazása előtt.

A szerzők az első kísérletben összesen 310 mangalica petesejtet maturáltattak (42 óra) *in vitro*, majd fagyasztottak a nyitott végű, leszűkített keresztmetszetű műszalma (OPS) vitrifikációs módszerrel. A visszaolvasztást követően elbíralták, hogy a petesejtek hogyan reagáltak a fagyasztásra és az oldatban előforduló krioprotektív anyagokra, valamint megvizsgálták, hogy a termékenyülést követően az embriófejlődés hogyan alakult.

A második vizsgálatban 5 mangalica kocából mostak ki embriókat, azokat fagyasztották, majd a visszaolvasztást követően az embriókat nagy fehér sertésekbe ültették vissza.

Eredményeik azt mutatják, hogy a vágóhídi petefészekből származó, éretlen mangalica petesejtek 42 óra alatt sikeresen érlelhetők *in vitro* körülmények között. A fagyasztott/visszaolvasztott mangalica petesejtek termékenyítése sikeresnek mondható, mert az embriófejlődést a termékenyített petesejtek $50,62 \pm 5,97\%$ -a megkezdte.

A fagyasztott/visszaolvasztott mangalica embriók beültetéséből malacok nem születtek; a recipiens állatok vizsgálatakor, a beültetést követő huszonötödik napon nem tapasztaltak vemhesülést. A jövőben tervezik a vizsgálatok folytatását.

SUMMARY

Varga, E. – Egerszegi, I. – Rátky, J. – Tempfli, K. – Pataki, R. – Bali Papp, Á.: CRYO-PRESERVATION OF MANGALICA OOCYTES AND EMBRYOS

The development of our knowledge of maturation, fertilization and cultivation of mammalian oocytes under laboratory conditions is progressing rapidly, and its results assist in the improvement of biotechnological methods. Presently, *in vitro* embryo production has become routine in a range of animal species. However, in pig, there is need for more research before widespread use of biotechnological methods may be put into practice.

In the first experiment, 310 Mangalica oocytes were matured *in vitro* for 42 hours. *In vitro* matured Mangalica oocytes were vitrified with the Open Pulled Straw (OPS) vitrification method. The effects of vitrification and cryoprotectants on oocyte morphology were investigated after warming. Furthermore, we observed embryo development during cultivation.

In the second part of study, the oestrus of 5 Mangalica sows was synchronized and superovulation was induced. Embryos were collected from donor sows in median laparotomy on the 5th day after artificial insemination. The embryos were selected under stereo microscope, and were then vitrified with OPS method. After warming, the Mangalica embryos were transferred into Large White recipient sows.

The results show that immature Mangalica oocytes could be successfully matured under laboratory conditions within 42 hours. Vitrified/warmed oocytes were fertilized and therefore $50.62 \pm 5.97\%$ of the oocytes started cleavage.

Implantation of vitrified/warmed Mangalica embryos into Large White sows was ineffective, as none of the sows was pregnant on the 25th day after transfer. Further experiments are needed to improve the efficiency of vitrification in the Mangalica breed.

BEVEZETÉS

Gaméták- és embriók megőrzésével kapcsolatos vizsgálatokat már az 1970-es években végeztek. A krioprezervációval – a gaméták, embriók fagyasztva tárolásával – biztosítható az örökítőanyag megőrzése, annak globális szállítása, segítségével mód nyílna tenyésztés újratelemzésére és/vagy szaporítására, a szelekciós nyomás növelésére. A krioprezerváció megvalósítható hagyományos, lassú hűtéssel, illetve vitrifikációs technikákkal.

Magyarországon a humán petesejtfagyasztás-visszaolvasztás termékenyítés módszerének eredményességét az első magyar kisbaba megszületése bizonyítja (Koncz és mtsai, 2008). A megfelelő petesejtek kiválasztásában nagyon hasznos az osztódási orsó állapotának vizsgálata (Kanyó és mtsai, 2004)

A sertés gaméták és embriók hűtéssel szembeni érzékenysége korlátozza az alkalmazható technikákat, esetükben ugyanis a hagyományos hűtési eljárások alacsony hatásfokúak, a megoldást a vitrifikáció jelentheti. Az eljárás segítségével kiküszöbölhető az intra- és az extracelluláris jégkristály-képződés, amivel növelhető a sejtek hűtéssel-szembeni toleranciája.

A mangalica, ősi magyar zsírsertés. Mangalica petesejtek és embriók vitrifikációjával korábban még nem foglalkozott egy kutatócsoport sem. A legújabb DNS-mikroszatellit vizsgálatok bebizonyították, hogy a színváltozatok önálló fajták, illetve megállapították, hogy egymáshoz a szőke és a fecskehasú mangalica áll a legközelebb (Zsolnai és mtsai, 2006). Az Állattenyésztési és Takarmányozási Kutatóintézetben a mangalica szaporaságának javítása céljából folynak kutatások (Egerszegi és mtsai, 2003; Rátky és mtsai, 2005). A mangalicatenyésztés egyik legfontosabb célja a fajta megmentése, megőrzése, ezzel hozzájárulva a természeti környezet sokszínűségéhez.

A tanulmány célja annak megállapítása volt, hogy az őshonos mangalica sertés petesejtek milyen módon alkalmazhatók az *in vitro* embrió-előállító rendszerben; továbbá miképpen lehetséges a mangalica oociták, illetve az embriók nyitott végű műszalma (OPS) eljárással történő megőrzése.

ANYAGOK, MÓDSZEREK

Első vizsgálat: mangalica petesejtek vitrifikációja

In vitro érlelt mangalica petesejteket OPS-vitrifikációs módszerrel fagyasztottuk, majd a visszaolvasztást követően elbíraltuk, hogy a petesejtek hogyan reagáltak az oldatban előforduló krioprotektív anyagokra (CPA), továbbá a termékenyülést követően megvizsgáltuk az embriók fejlődését.

Alkalmazott vegyszerek

A felhasznált vegyszereket a Sigma–Aldrich (Budapest) Kft-től és a Werft-Chemie GmbH-től (Bécs) vásároltuk. A szükséges mangalica petefészkeket a Pick Szeged Rt. és a Lábodi Vágóhid biztosította. A szervek laboratóriumba szállítása 38 °C-os fiziológiás sóoldatot (0,9% [w/v] NaCl) tartalmazó termosztóban történt.

A petefészkeket CETAB-, majd fiziológiás sóoldatban háromszor átmosva fertőtlenítettük. A kumulusz-petesejt-komplexek (COC) kinyeréséhez TL-Hepes oldatot (Hagen és mtsai, 1991) használtunk, melyet 0,1% polivinil-alkohollal egészítettünk ki (TL-Hepes-PVA). A petesejteket TCM-199-oldatban (Mattioli és mtsai, 1989) maturáltattuk, melyet sertés follikulus folyadékkal, nátrium-piruváttal, ciszteaminnal, glutaminnal, antibiotikumokkal, és az érés első 20 órájában hormonokkal egészítettünk ki. A vitrifikációs eljárás során használt alapoldat TL-Hepes-TCM-199 volt, melyet 5 mg/ml BSA-val egészítettünk ki. A fagyasztáskor az alapoldathoz krioprotektív anyagokat (CPA) adtunk [etilén-glikol (EG), dimetil-szulfoxid (DMSO)], melyek végső koncentrációja 6,5–6,5 M volt. Visszaolvasztáskor a CPA-k kivonásához és a rehidrációhoz, az oldatokhoz szaharózt (0,75 illetve 0,5 M) adtunk. Az *in vitro* termékenyítéshez módosított TBM (mTBM) oldatot (Abeydeera és mtsai, 1997) használtunk. Az embriók kultiválása NCSU-23 oldatban történt (Petters és Wells, 1993).

Petesejtek kinyerése

A vizsgálatokhoz sárgatest és ciszta nélküli petefészkeket használtunk. A 3–6 mm átmérőjű tüszőkből, a tüszőfolyadékot, és a benne lévő COC-ket, 10 ml-es kézifecskendő és a hozzá csatlakoztatott 18 G-jelű tű segítségével szívtuk le, majd a follikulus folyadékot (benne az oocitákkal) centrifugacsövekbe gyűjtöttük. A sejtek leülepedése és a felülúszó eltávolítása után, a visszamaradt sejteket Hepes-TCM-199 oldattal reszuszpendáltuk, majd mikroszkóp (Nikon) segítségével (40 × nagyítás) megkezdjük a COC-k kiválogatását.

Petesejtek in vitro maturációja (IVM)

Az IVM-hoz csak jó minőségű, többbrétegű, kompakt kumuluszállománnyal rendelkező petesejteket használtunk fel. A COC-ket háromszor átmostuk a maturációhoz használt oldatban, majd „négylyukú” tenyésztőedényben (NUNC), 50 COC/500 µl oldatban, 42 órán keresztül, 5% CO₂-tartalmú gázkeverékben, 38,5 °C-on érleltük. A maturáció első felében (0–20. óra) az oldatot hormonokkal egészítettük ki (10 IU/ml hCG és 10 IU/ml eCG); az IVM második részében (20–42 óra) a petesejtek tenyésztése hormonmentes oldatban történt.

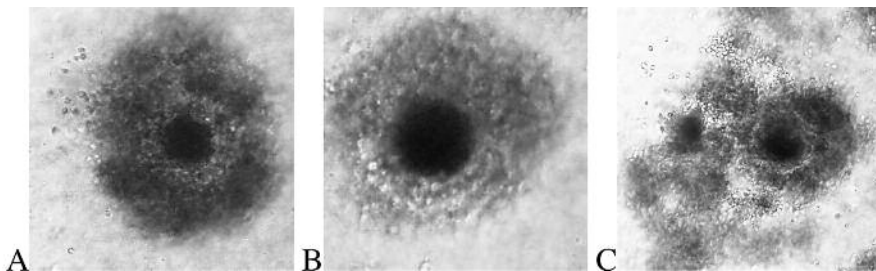
A maturáció eredményességének elbírálása az expandálódási arány és a maturációs ráta kifejezésével történt. Ennek meghatározásához az IVM után, 30–30 COC-t véletlenszerűen kiválogattunk, majd feljegyeztük, hogy a sejtek mekkora része rendelkezett expandálódott kumuluszállománnyal (1. ábra).

Ezt követően pipettázással eltávolítottuk a kumuluszsejteket a petesejtek felszínéről, majd az oocitákat ecetsav és etanol 1:3 arányú keverékében 3 napig fixáltuk. Ezt követően a sejteket 0,1%-os ecetsavas-orceinnel festettük, és mikroszkóp segítségével (400×nagyítás) megvizsgáltuk a sejtmagot. Érettnek tekintettük azokat a petesejteket, melyek metafázis II osztódási stádiumban voltak.

Mangalica petesejtek fagyasztása és visszaolvasztása

A petesejteket a Vajta és mtsai (1997) által leírt, nyitott végű műszalma” (OPS) eljárással vitrifikáltuk.

1. ábra: Kumuluszsejtek morfológiai változása az érés során



kompakt kumuluszállomány (A); expandálódó kumuluszállomány az IVM 24. órájában (B), expandálódott kumuluszállomány az IVM 42. órájában (C) (Saját felvétel)

Fig. 1.: Changing cumulus morphology during maturation: (Self-made photos)
oocyte with compact cumulus (A); oocyte with slightly expanded cumulus at 24 h of IVM (B); oocyte with expanded cumulus at 42 h of IVM (C)

- *Petesejtek fagyasztása*

A fagyasztást megelőzően, a petesejteket krioprotektív anyagokat (CPA) tartalmazó oldatokban, 2 lépcsőben, ekvilibráltattuk. Az első ekvibráció (3 perc) során alkalmazott oldatban a CPA-k (EG és DMSO) koncentrációja 2–2 M volt, míg a második ekvibráció (1 perc) 6,5–6,5 M EG-t és DMSO-t tartalmazó oldatban történt. Ezt követően a petesejteket tartalmazó, körülbelül 10 µl nagyságú médiumcseppeket nyitott végű, leszűkített keresztmetszetű műszalmákba szívtuk fel kapilláris elven, majd azonnal folyékony nitrogénbe mártottuk azokat.

- *Petesejtek visszaolvasztása*

A petesejtek visszaolvasztása három lépcsőben történt. A műszalmákat ujjaink közé fogva (~36°C) felmelegítettük 0,5–1 perc alatt. Visszaolvasztáskor a petesejteket 5–5 percig, csökkenő szaharóz-koncentrációjú (0,75 M, majd 0,5 M) oldatokban ekvilibráltattuk, végül az oocitákat szaharóz-mentes alapoldatba helyeztük.

- *A petesejtek vizsgálata a visszaolvasztást követően*

A visszaolvasztás után mikroszkóppal (40 x nagyítás) megvizsgáltuk a petesejtek morfológiáját. A későbbi *in vitro* termékenyítéshez azokat a petesejteket használtuk, melyek ooplazmája sötét és homogén volt, a *zona pellucida* nem sérült, illetve a petesejtek alakja is normális volt.

In vitro termékenyítés (IVF)

A visszaolvasztás után a morfológiailag normálisnak ítélt oocitákat háromszor átmostuk a termékenyítéshez használt mTBM oldatban, majd ásványi olajjal fedett 90 µl-es, mTBM médiumcseppbe helyeztük (30 petesejt/90µl mTBM) és a termékenyítésig termosztátban tároltuk. Az IVF-hez fagyasztott/visszaolvasztott kan-spermát használtunk. A műszalmákat 37 °C-os vízfürdőbe helyezve, 1 perc alatt visszaolvasztottuk, majd a spermát 8 ml előinkubált mTBM-be helyeztük, és két

percig 3000/perc fordulatszámon centrifugáltuk. A kapott pelletet 70 µl mTBM oldattal reszuszpendáltuk. Thoma-sejtszámláló kamra segítségével megállapítottuk a szuszpenzió koncentrációját, majd 1×10^5 spermium/ml-re állítottuk be. Végül 10 µl spermium-szuszenziót adtunk a 90 µl-es médiumcsepphez (melybe előzőleg a petesejteket tettük), majd a petesejteket és a spermiumokat 4 órán keresztül termosztátban együtt inkubáltuk.

Embriók tenyésztése (IVC)

A termékenyítést követően, a petesejteket háromszor átmostuk az embriótenyésztéshez használt oldatban, majd 30 petesejt/500 µl NCSU-23 oldatban tenyésztettük 4 napon keresztül 38,5 °C-on, 5% CO₂-tartalmú gázkeverékben.

Kísérleti terv

A vitrifikációs eljárásakor *in vitro* maturáltatott (42 h), kumuluszsejtekkel körülvett mangalica (M-csoport) sertés petesejteket használtunk. Kontroll csoportként mangalica (KM-csoport) petesejteket maturáltattunk (42 h), majd termékenyítettünk.

1. Az IVM után meghatároztuk a mangalica petesejtek maturációjának hatékonyságát az expandálódási arány és a sejtmag érése alapján.

2. A vitrifikációt követően megállapítottuk a petesejtek eljárással szembeni érzékenységét a visszaolvasztást követő degenerálódási arány alapján.

3. Összehasonlítottuk a termékenyítést követő *in vitro* embriófejlődést a vitrifikált és a kontroll csoportok között.

Statisztikai vizsgálat

Minden vizsgálatot háromszor megismételtünk. Az eredmények értékelése a STATISTICA programmal (ANOVA) történt. A csoportok közötti különbségeket Duncan's teszttel vizsgáltuk. Szignifikáns különbségnek azt tekintettük, ahol a valószínűség $P < 0,05$ volt.

Második vizsgálat: Mangalica embriók vitrifikációja

A vizsgálat során embriókat mostunk ki előzetesen szuperovuláltatott mangalica kocákból, majd az embriókat OPS eljárással vitrifikáltuk, és recipiens nagy fehér fajtacsoportba tartozó kocákba ültettük.

Alkalmazott vegyszerek

Az ivarzás szinkronizálás és a szuperovuláltatás során felhasznált vegyszerek a következők voltak: Regumate®, eCG, GnRH. Az állatok altatása ketaminnal (SBH-Ketamin) és xylazinnal történt. Az embriók kimosásához és gyűjtéséhez PBS-oldatot használtunk.

A donor kocák hormonális kezelése

Az embrió-átültetési programba bevont 5 kocánál ivarzás szinkronizálást végeztünk: 15 napon keresztül, napi 5 ml/állat adagoltunk *p.os* progesztagén hatású Regumate®-ot (Hoechst-Roussel), a 16. napon 1000 NE eCG-t (Folligon, Intervet) injektáltunk (tüszőnövekedés stimulálása), ezután 50 µg GnRH-t (Fertagyl, Intervet) aplikáltunk (ovuláció indukció). Az állatokat a 20. illetve a 21. napon mesterségesen termékenyítettük.

Embriók in vivo kinyerése, és az embriók vizsgálata

Az embriókat előzetesen 24 órán át koplaltatott donor mangalicákból medián laparotómiában mostuk ki az első termékenyítést követő 5. napon (2. ábra). Az invazív állatkísérleteket a Pest megyei Állategészségügyi és Élelmiszerellenőrző Állomás 205/024/Pest/2006 etikai bizottsági engedélyével végeztük.

A műtéti narkózist 100 testsúly kg-onként 10 ml ketaminnal (SBH-Ketamin, SelBruha) és 4 ml xylazinnal (Xylavet, Lavet) intravénásan biztosítottuk. A hasüregből kiemelt méh kraniális 15 cm-es szakaszából mindkét méhszarvból 50–50 ml PBS oldattal mostuk ki az embriókat. A műtét után, a donor kocák egyedi kutricában, 2–3 napig, kímélő takarmányozás mellett, nyújtott hatású antibiotikus kezelést kaptak.

2. ábra: Sárgatestek ellenőrzése (A) és az embriók-kinyerése a méhszárv átmosásával (B) (Saját felvétel)

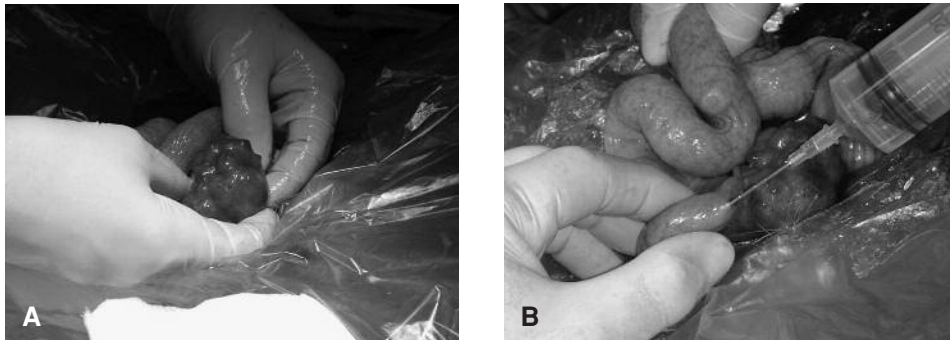


Fig. 2.: Controlling the corpus luteum (A), embryo recovery by washing uterine horn (B) (Self-made photos)

Az embriók fagyasztása és visszaolvasztása

Az embriókat mikroszkóp segítségével válogattuk ki, majd a Vajta féle OPS-vitrifikációs protokoll szerint fagyasztottuk és olvasztottuk vissza.

Az embriók beültetése

A nagy fehér fajtacsoportba tartozó recipiens kocák hormonkezelése a donor mangalicákéval megegyezett, de a recipienseket nem szuperovuláltattuk, ezért

mindössze 800 NE eCG-vel kezeltük, a Regumate® etetést követően. A műtéti előkészítés is hasonló volt, mint a kimosáshoz; a petefészek vizsgálatokat követően ültettük az embriókat a méhszarv csúcsi szakaszába.

A vemhesség vizsgálata

A korai vemhesség megállapítása a Pie Medical® (Maastricht, Hollandia) által gyártott Falco 100 típusú készülékkel történt. Az 5–7,5 MHz-es konvex vizsgálófejjel a beültetést követő 25. napon (30. napos magzat) végeztük a szkennelést.

Kísérleti terv

A vizsgálatokhoz öt mangalica koca ivarzását szinkronizáltuk, majd tüszőnövekedést indukáltunk, és mesterségesen termékenyítettünk. Műtéti úton mostuk ki az embriókat a donor állatokból, majd mikroszkóp alatt kiválogattuk, meghatároztuk fejlettségi állapotukat. OPS–vitrifikációs eljárással fagyasztottuk/visszaolvasztottuk az embriókat, melyeket nagy fehér sertésekbe ültettünk. Az embriótranszfert követő 25. napon ellenőriztük a vemhességet.

EREDMÉNYEK

Első vizsgálat: mangalica petesejtek vitrifikációja

Mangalica petesejtek maturációja

A kísérlet során (három ismétlésben) összesen 310 mangalica petesejtet maturáltattunk. A 42 órás IVM után $82,99 \pm 2,32\%$ expandálódási arányt tapasztaltunk. A kumuluszsejtek expandálódása a citoplazma érésének egyik mutatója. A sejt-mag érésének vizsgálatakor megfigyeltük, hogy a vizsgált 90 petesejt $71,11 \pm 5,09\%$ -a, 42 óra maturáció alatt, a metafázis II osztódási stádiumáig jutott (3. ábra).

Mangalica petesejtek vitrifikációja

Három ismétlésben összesen 171 petesejtet fagyasztottunk az OPS módszerrel. A visszaolvasztást követő morfológiai vizsgálat során azt tapasztaltuk, hogy az oociták átlagosan 69,95%-a degenerálódott az eljárás során (4. ábra).

Az embriófejlődés vizsgálata

A fagyasztott/visszaolvasztott mangalica petesejtek a termékenyítést követően $50,62 \pm 5,97\%$ -ban kezdték meg az embriófejlődést, míg ez az arány a kontroll csoportban (melyben a petesejteket nem vitrifikáltuk, hanem az IVM után azonnal termékenyítettük) $64,52 \pm 4,18\%$ volt. A két csoport közötti különbség statisztikailag ($P < 0,05$) nem igazolható (5. ábra).

3. ábra: Az IVM eredményességét jelző mutatók: a sejtmag érése és az expandálódási arány 42 óra IVM után

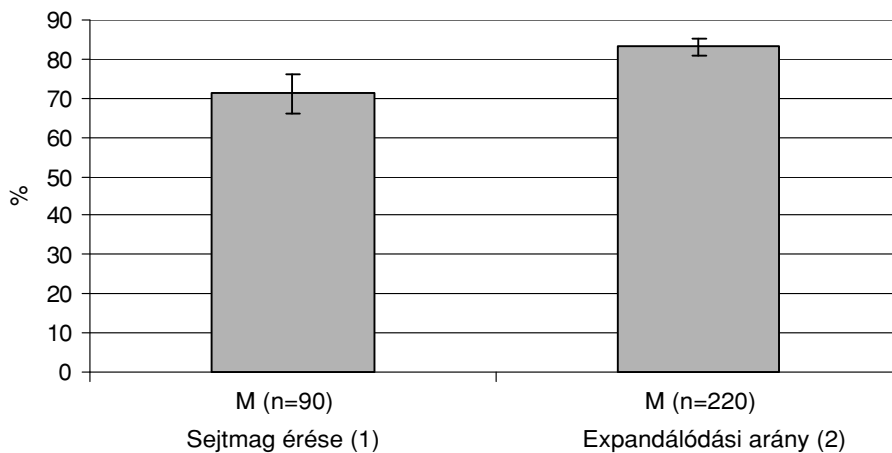


Fig. 3.: Nuclear maturation and cumulus expansion rate after 42 h IVM
Nuclear maturation (1), expansion rate (2)

4. ábra: Normális morfológiájú COC-k a visszaolvasztást követően (A); a vitrifikációs eljárás során degenerálódott petesejt (B) (Saját felvétel)

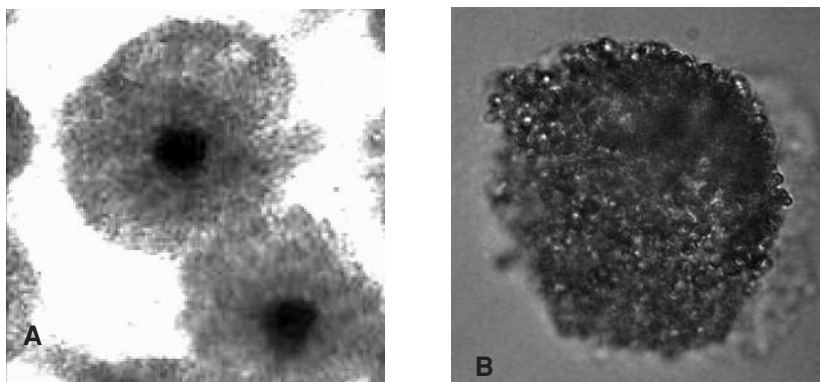
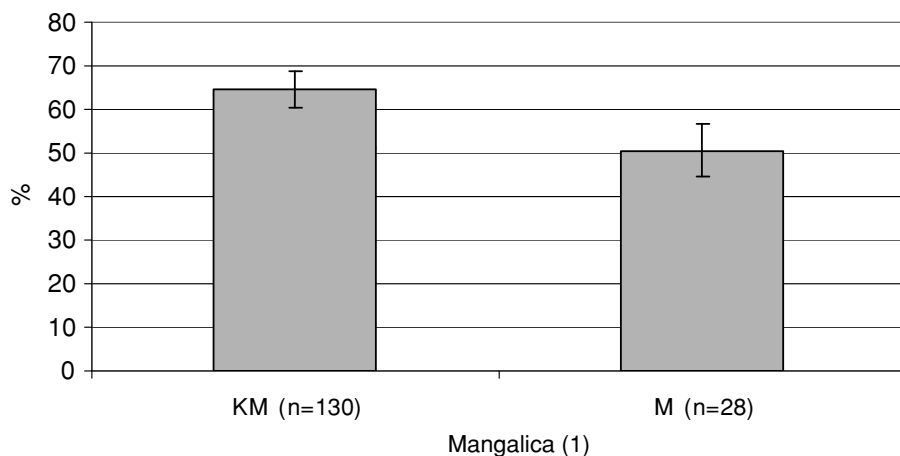


Fig. 4.: COC-s with normal morphology after thawing (A); degenerated oocyte during vitrification (B) (Self-made photos)

A fagyasztott/visszaolvasztott, termékenyített petesejtek 4 napig tartó kultiválása kapott eredményeinket a 6. ábra szemlélteti. A csoportokban megfigyelt fejlődési stádiumok között szignifikáns különbséget ($P < 0,05$) nem tapasztaltunk. Morula embriókat csak a kontroll csoportban tudtunk megfigyelni, $16,72 \pm 4,8\%$ arányban.

5. ábra: Az embriófejlődést megkezdett sejtek aránya (IVC 4 nap)



KM: kontroll, M: vitrikált (2)

Fig. 5.: Cleavage rate of embryos (IVC 4 days)
Mangalica (1), KM: vitrified, M: control

6. ábra: Mangalica [kontroll (KM) és vitrikált (M) csoportok] embriók fejlettségi stádiuma az embriótenyésztés 4. napján

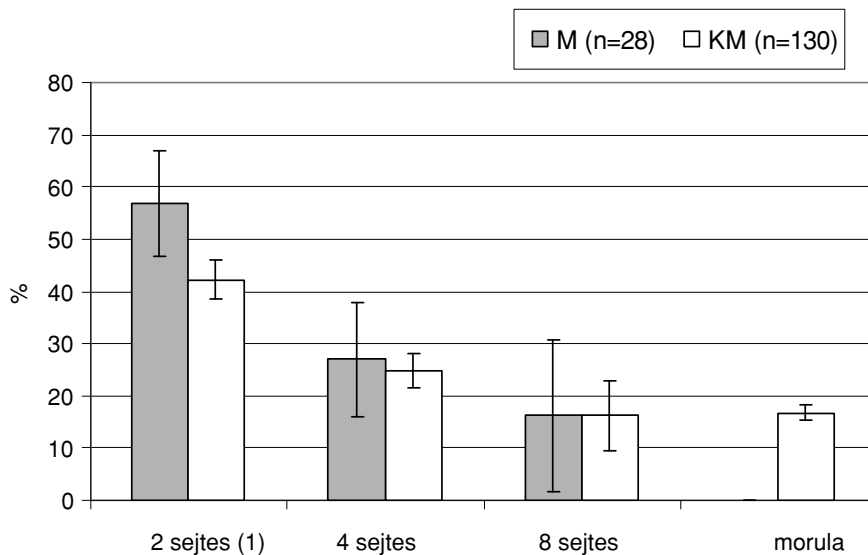


Fig. 6.: Status of development of Mangalica embryos [control (KM) and vitrified (M) groups] on day 4 of embryo cultivation
cells (1)

Második vizsgálat: mangalica embriók vitrifikációja

A donor mangalica kocák petefészkein megfigyelt képletek, illetve a kinyert embriók számát, fejlettségi állapotát mutatja be az 1. táblázat.

1. táblázat

Donor állatok petefészkek-képletei és a kinyert embriók fejlettségi állapota

Állatok (1)	Petefészkek állapota (2)		Kinyert embriók (3)
1.	0 sárgatest, 0 ciszta	3 sárgatest	1 db 4-sejtes embrió (6)
2.	6 ciszta (4)	9 ciszta	0
3.	24 sárgatest (5)	26 sárgatest	2 db 4-sejtes, 2 db blasztociszta, (7) 1 db petesejt (8)
4.	14 ciszta	3 ciszta, 3 sárgatest	0
5.	13 sárgatest	16 sárgatest	5 db petesejt, 5 db 4-8 sejtes embrió, 6 db morula

Table 1: Ovarian features of donor sows and the state of development of the recovered embryos sows (1), ovarian features (2), recovered embryos (3), cysta (4), corpus luteum (5), embryo with 4 cells (6), blastocyst (7), ova (8)

A kísérlet során beültetésre került: 3 db 4-sejtes, 5 db 4–8-sejtes, 6 db morula és 2 db blasztociszta embrió. A transzfert követő 25. napon, sajnálatos módon, nem tapasztaltunk vemhesülést.

KÖVETKEZTETÉSEK

Első vizsgálat: mangalica petesejtek vitrifikációja

A hűtés során fellépő károsodások csökkenthetők a különböző krioprotektív anyagok kombinálásával, többlépcsős ekvilibráltatással a hűtés előtt; a petesejtek lipidtartalmának eltávolításával vagy polarizálásával, előhűtött oldatok használatával (Isachenko és mtsai, 1998; Hochi és mtsai, 2001, Esaki és mtsai, 2004). Vizsgálataink során krioprotektív anyagként (CPA) etilén-glikolt és a dimetilszulfoxidot használtunk, és a CPA-k növekvő koncentrációjára nézve, többlépcsős ekvibrációt alkalmaztunk. A mangalica petesejtek esetében a visszaolvasztást követő embriófejlődés megtorpant a 8-sejtes stádiumban, de a kontroll mangalica csoportban az embriók 16,72%-a, a négy napos kultiválás alatt eljutott a szedercsíra állapotig.

A vizsgálat eredményeiből az alábbi következtetések vonhatók le:

- Mangalica petesejtek sikeresen maturáltathatók *in vitro*.
- A mangalica petesejtek rendkívül érzékenyen reagálnak a hűtésre. A visszaolvasztást követő morfológiai vizsgálat alapján, az oociták átlagosan 69,95%-a degenerálódott az eljárás közben.
- A fagyasztott/visszaolvasztott mangalica petesejtek *in vitro* termékenyítése sikeresnek mondható.

- Az embriófejlődés, a négy napos kultiváció során a vitrifikált csoportban a 8-sejtes stádiumig jutott, de a kontroll csoportban morula állapotú embriókat is meg tudunk figyelni.

Javasataink a következők:

- A mangalica petesejtek OPS-vitrifikációs eljárással szembeni nagyfokú érzékenysége miatt a vitrifikációs eljárás módosítása javasolt.
- Feltételezzük, hogy az oociták hűtéssel szembeni toleranciája növelhető az oldathoz adagolt fehérje- és membránstabilizátorokkal, melyeket a jövőben tervezünk kipróbálni. Szükség van azonban a mikrofilamentumok és egyéb sejtorganellumok szerkezetének elemzésére és kromoszóma-vizsgálatokra is.

Második vizsgálat: mangalica embriók vitrifikációja

Fagyasztott mangalica embriókból származó malacok megszületéséről még nem számolt be egyetlen tanulmány sem. Kísérletünkben, a recipiensekbe ültetett fagyasztott/visszaolvasztott mangalica embriókkal vemhesülést nem tapasztaltunk. Ennek oka egyrészt az, hogy a beültetett embriók száma kevés volt (különböző kutatócsoportok átlagosan 50 embriót ültetnek be egy-egy recipiensbe, esetünkben a beültetett embriók száma összesen 16 volt). Másrészt abban keresendő, hogy többnyire korai fejlettségi stádiumban lévő embriók kerültek beültetésre, ezek az embriók pedig fokozottan érzékenyek a hűtéssel szemben, ami elsősorban nagy lipidtartalmuknak köszönhető. A korai embriók esetében ugyanis nagyobb lipidtartalmat állapítottak meg, mint az előrehaladottabb fejlettségű embriókban (*Nagashima és mtsai*, 1996). A lipid növeli a petesejtek hipotermiás érzékenységét és visszafordíthatatlan károsodást okoz a membrán struktúrában $+10^{\circ}\text{C}$ és -5°C között. A petesejtek/embriók sejtváznak épsége létfontosságú a cito- és kariokinézishez, az embrió alakjának fenntartásában, a sejtciklus normális lezajlásához, kromoszóma-szegregációhoz és a sejten belüli kommunikációhoz (*Dobrinisky*, 1996). Petesejtek/embriók hűtés során fellépő károsodásokkal szembeni ellenálló-képessége növelhető citohalazin-B-t (CB) tartalmazó oldatban történő elő-ekvilibrálattal. A CB hatására a blasztomerekben a mikrotubulusok károsodása a fagyasztás és a visszaolvasztás során nem válik irreverzibilissé; ugyanis a CB a citoskeleton rugalmasabbá teszi, így védve azt a hűtés során. A fetuin egy borjósavóban található glükoprotein, mely a vitrifikáció során keletkező membránkárosodások kivédésére sikeresen alkalmazható (*Horváth és mtsai*, 2008). A jövőben tervezzük a vizsgálat megismétlését, amely során citohalazin-B előkezelést szeretnénk alkalmazni, ezzel párhuzamosan fetuin hozzáadását tervezzük a vitrifikációs közeghez a jobb eredmények elérése érdekében. Reméljük, hogy a vitrifikációs közeg további módosításával (növekedési faktorok hozzáadása) hamarosan malacok születéséről is be tudunk számolni.

A vizsgálataink során fagyasztott/visszaolvasztott embriókból malacok nem születtek. A recipiens állatok vizsgálatakor, a beültetést követő 25. napon nem tapasztaltunk vemhesülést. Ez nem feltétlenül jelenti azt, hogy a mangalica embriókból ilyen úton nem lehet utódokat produkálni – a közeljövőben a kísérlet megismétlését tervezzük. Feltételezhetően a citohalazin-B előkezelés alkalmazásakor

az embrió blasztomereiben a mikrotubulusok károsodása a fagyasztás és visszolvasztás során nem válik irreverzibilissé. Az okok felderítésére a jövőben további vizsgálatok szükségesek.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

A vizsgálatok költségeit a „Kísérletek sertés petesejtek és embriók *in vitro* és *in vivo* termeltetésére és hűtésére vitrifikációval” T43131 OTKA pályázat biztosította.

IRODALOM

- Abeydeera L.R. – Day B.N. (1997): *In vitro* penetration of pig oocytes in a modified Tris-buffered medium: effect of BSA, caffeine and calcium. *Therio.*, 48. 537–544.
- Dobransky J.R. (1996): Cellular approach to cryopreservation of embryos. *Therio.*, 45. 17–26.
- Egerszegi I. – Schneider F. – Rátky J. – Soos F. – Solti L. – Manabe N. – Brüssow K.P. (2003): Comparison of luteinizing hormone and steroid hormone secretion during the peri- and post-ovulatory periods in Mangalica and Landrace gilts. *J. Reprod. Dev.*, 49. 291–296.
- Esaki R. – Ueda H. – Kurome M. – Hirakawa K. – Tomii R. – Yoshioka H. – Ushijima H. – Kuwayama M. – Nagashima H. (2004): Cryopreservation of porcine embryos derived from *in vitro* matured oocytes. *Biol. Reprod.*, 71. 432–437.
- Hagen D.R. – Prather R.S. – Sims M.M. – First N.L. (1991): Development of one-cell porcine embryos to the blastocyst stage in simple media. *J. Anim. Sci.*, 69. 1147–1150.
- Hochi S. – Akiyama M. – Minagawa G. – Kimura K. – Hanada A. (2001): Effects of cooling and warming rates during vitrification on fertilization of *in vitro* matured bovine oocytes. *Cryobiol.*, 42. 69.
- Horváth G. – Seidel G.E. Jr. (2008): Use of fetuin before and during vitrification of bovine oocytes. *Reprod. Dom. Anim.* 43. 333–338.
- Isachenko V. – Soler C. – Isachenko E. – Perez-Sanchez F. (1998): Vitrification of immature porcine oocytes: effects of lipid droplets, temperature, cytoskeleton and addition and removal of cryoprotectant. *Cryobiol.*, 36. 250–253.
- Kanyó Katalin – Konc, J. – Cseh, S. (2004): Az osztódási orsó állapotvizsgálatának jelentősége a petesejtek minőségbirodatában és az IVF-ET-kezelés hatékonyságának javításában. Első hazai tapasztalatok. Magyar Nőorvosok Lapja, 67. 73–79.
- Konc, J. – Kanyo, K. – Varga, E. – Kriston, R. – Cseh, S. (2008): Oocyte cryopreservation: the birth of the first Hungarian babies from frozen oocytes. *J. Assist. Reprod. Genet.*, 25. 7. 349–352.
- Mattioli M. – Bacci M.L. – Seren E. (1989): Developmental competence of pig oocytes matured and fertilized *in vitro*. *Therio.*, 31. 1201–1207.
- Nagashima H. – Kuwayama M. – Grupen C.G. – Ashman R.J. – Nottle M.B. (1996): Vitrification of porcine early cleavage stage embryos and oocytes after removal of cytoplasmic lipid droplets. *Therio.*, 45. 180.
- Petters R.M. – Wells K.D. (1993): Culture of pig embryos. *J. Reprod. Fertil.*, 48. 61–73.
- Rátky J. – Brüssow K.P. – Egerszegi I. – Torner H. – Schneider F. – Solti L. – Manabe N. (2005): Comparison of follicular and oocyte development and reproductive hormone secretion during the ovulatory period in Hungarian native breed, Mangalica, and Landrace gilts. *J. Reprod. Dev.*, 51. 427–432.
- Szabó P. (2006): A mangalica reneszánsza. Állattenyésztés és Takarmányozás, 55. 203–216.
- Vajta G. – Holm P. – Greve T. – Callesen H. (1997): Vitrification of porcine embryos using the Open Pulled Straw (OPS) method. *Acta. Vet. Scand.*, 38. 349–352.
- Yoshino J. – Kojima T. – Shimizu M. – Tomizuka T. (1993): Cryopreservation of porcine blastocysts by vitrification. *Cryobiol.*, 30. 413–422.
- Zsolnai A. – Radnóczy L. – Fésüs L. – Anton I. (2006): Molekuláris genetikai módszerek alkalmazásának eredményei a mangalicatenyésztésben. Állattenyésztés és Takarmányozás, 55. 224.

Érkezett: 2008. május
Szerzők címe: *Varga Erika, Tempfli Károly, Pataki Renáta, Bali Papp Ágnes
Authors' address: Nyugat-Magyarországi Egyetem,
 Mezőgazdaság- és Élelmiszertudományi Kar,
 West Hungary, Faculty of Agricultural and Food Sciences
 H-9200 Mosonmagyaróvár, Vár 2.
 *E-mail: evarga@mtk.nyme.hu

Egerszegi István, Rátky József
 Állattenyésztési és Takarmányozási Kutatóintézet,
 Research Institute for Animal Breeding and Nutrition,
 H-2053 Herceghalom, Gesztenyés u. 1.