

DIPLOMADOLGOZAT

Debnár Viktória Johanna
Mezőgazdasági biotechnológus MSc

Gödöllő
2023



Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem

Szent István Campus

Mezőgazdasági Biotechnológus Szak

JUH EMBRIÓK *IN VITRO* ELŐÁLLÍTÁSA

Belső konzulens: Dr. Bodó Szilárd
Tudományos Tanácsadó

Készítette: Debnár Viktória Johanna
GKCJ6J
levelező tagozat

Intézet/Tanszék: MATE ÁTI PÁTÁB

Gödöllő

2023

TARTALOMJEGYZÉK

| | |
|---|----|
| 1. Bevezetés és célkitűzések..... | 6 |
| 2. Szakirodalmi áttekintés | 10 |
| 2.1. Őshonos állataink védelme | 10 |
| 2.2. Asszisztált reprodukciós technológiák | 10 |
| 2.2.1. Spermagyűjtési eljárások..... | 10 |
| 2.2.2. Spermafeldolgozás..... | 12 |
| 2.2.3. Az ondósejtek mozgási paramétereinek értékelése digitalizált eljárással (CASA rendszer)..... | 14 |
| 2.2.4. Kos sperma mélyhűtése | 15 |
| 2.2.5. A kossperma mélyhűtés módszerei | 15 |
| 2.2.6. A mélyhűtött sperma minőségét befolyásoló tényezők..... | 16 |
| 2.2.7. Spermakezelési eljárások..... | 17 |
| 2.2.8. Felolvasztási eljárás | 18 |
| 2.3. Spermiumszeparálási eljárások..... | 18 |
| 2.3.1. Spermamosás | 19 |
| 2.3.2. Swim-up, felúsztatásos módszer | 19 |
| 2.4. <i>In vitro</i> embrióelőállítás (IVEP) | 20 |
| 2.4.1. Petesejt gyűjtési technikák..... | 20 |
| 2.4.2. A petesejtek minőségét befolyásoló tényezők..... | 21 |
| 2.4.3. A donor életkora | 21 |
| 2.4.4. A petefészek tüzöméréte | 22 |
| 2.5. <i>In vitro</i> érlelés (IVM)..... | 23 |
| 2.6. <i>In vitro</i> termékenyítés (IVF) | 24 |
| 2.6.1. IVF-hez használt termékenyítőanyag | 25 |
| 2.7. <i>In vitro</i> tenyésztés (IVC)..... | 26 |
| 2.8. Embriók mélyhűtésének lehetőségei | 27 |
| 2.9. Embrióátültetés | 28 |
| 3. A vizsgálatok módszerei | 30 |
| 3.1. Ejakulált sperma kinyerése, mélyhűtése, értékelése | 30 |
| 3.1.1. Ejakulált sperma gyűjtése, feldolgozása..... | 30 |

| | | |
|--------|--|----|
| 3.2. | Mellékhere eredetű spermiumok mélyhűtése | 32 |
| 3.2.1. | Mellékhere eredetű spermiumok feldolgozása | 32 |
| 3.2.2. | Mélyhűtés és felolvasztás | 33 |
| 3.3. | Spermiumszeparálási eljárások | 34 |
| 3.3.1. | Spermamosásnál alkalmazott tápközegek összehasonlítása..... | 34 |
| 3.3.2. | Swim-up módszer | 35 |
| 3.3.3. | A vizsgálati minták felolvasztása, CASA vizsgálata ejakulált és mellékhere eredetű spermamintákkal..... | 35 |
| 3.3.4. | A különböző swim up módszerek összehasonlítása | 36 |
| 3.4. | Juh petesejtek <i>in vitro</i> előállítása | 36 |
| 3.4.1. | <i>In vitro</i> érlelés (IVM) | 38 |
| 3.4.2. | <i>In vitro</i> termékenyítés (IVF)..... | 38 |
| 3.4.3. | <i>In vitro</i> tenyésztés (IVC) | 39 |
| 3.5. | Embriók hosszú távú eltárolásának módszerei | 40 |
| 3.5.1. | Krioprezerválás, etilén-glikolos fagyasztás | 41 |
| 3.5.2. | Vitrifikáció, Cryotop® módszerrel..... | 42 |
| 3.6. | Az adatok kiértékelésének módja | 43 |
| 4. | Eredmények és értékelésük | 44 |
| 4.1. | Spermamosási eredmények..... | 44 |
| 4.2. | Swim-up hoz használt táptalajok összehasonlítása | 44 |
| 4.3. | Koncentrációváltozás a swim-up során | 50 |
| 4.4. | <i>In vitro</i> embrióelőállítás és mélyhűtés | 52 |
| 5. | Következtetések és javaslatok..... | 56 |
| 6. | Összefoglalás..... | 58 |
| 7. | Köszönetnyilvánítás | 60 |
| 8. | IRODALOMJEGYZÉK..... | 61 |
| 9. | Mellékletek..... | 73 |

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

| | |
|-------|---|
| ALH: | Amplitude of lateral head displacement (a fej oldalirányú elmozdulásának amplitúdója) |
| ART: | Assisted Reproduction Technology (asszisztált reprodukciós technikák) |
| BCF: | Beat cross frequency (a fej kilengésének frekvenciája) |
| BSA: | Bovine Serum Albumin |
| CASA: | Computer Assisted Semen Analysis |
| COC: | Cumulus-oocita komplex |
| CPA: | Krioprotektív anyag |
| DAP: | Distance average path (a megtett út átlagos hosszúsága) |
| DCL: | Distance in a curved line (ténylegesen megtett út hosszúsága) |
| DSL: | Distance in a straight line (a kiindulási és végpont között megtett egyenes útvonal) |
| IVC: | <i>In vitro</i> Culture (<i>in vitro</i> tenyésztés) |
| IVEP: | <i>In vitro</i> embryo production (<i>in vitro</i> embrióelőállítás) |
| IVF: | <i>In vitro</i> Fertilization (<i>in vitro</i> termékenyítés) |
| IVM: | <i>In vitro</i> Maturation (<i>in vitro</i> érlelés) |
| LIN: | Linearity (linearitási index) |
| MOT: | Motilitás |
| PBS: | Phosphate Buffered Saline |
| pMOT: | Progressive motility (progresszív motilitás) |
| STR: | Straightness (egyeneshaladási index) |
| SU: | Swim-up (felúsztatás) |
| TALP: | Tyrode's albumin lactate pyruvate médium |
| TCF: | Tris–citric acid–fructose, Tris puffer |
| VAP: | Average path velocity (átlagolt út sebessége, átlagsebesség) |
| VCL: | Curvilinear velocity (ívsebesség) |
| VSL: | Straight line velocity (egyenesvonalis sebesség, progresszív sebesség) |
| WOB: | Wobble (oszcillációs index) |

1. BEVEZETÉS ÉS CÉLKITŰZÉSEK

A juhokról azt mondják, hogy első háziasított faj volt, ezért a korai időktől kezdve szoros kapcsolatban álltak az emberrel (Shelton, 1995). A juhtartás az utóbbi években az új és fejlett technológiák fontos kutatási eszközévé vált. Az állat mérete és fiziológiája megfelelő modellállattá teszi az emlősök különféle biológiai funkcióinak, a szaporodásbiológia, embriológiai és a magzati fejlődés szempontjából. A juhtartás növelése lehetőséget biztosíthat a kisebb gazdaságok megélhetésének javítására, különösen a kevésbé fejlett országokban. A szaporasági hatékonyság fokozásával számuk növelhető, ennek módszere lehet a különféle asszisztált reprodukciós technológiák használata, mint a mesterséges termékenyítés, a embrióátültetés és a hozzá szorosan kapcsolódó eljárások, mint a szuperovuláció kiváltás, embriókinyerés, *in vitro* embrióelőállítás (Devendra, 1980; Zhu, et al., 2001; Mahammadpour, 2007).

A hortobágyi racka (*Ovis aries strepsiceros Hortobagyensis*) eredetét pontosan nem tudjuk, nagy valószínűséggel már a honfoglaló őseinkkel érkezett a Kárpát-medencébe, első igazolt régészeti leletek és írások a XVI-XVII. századból maradtak fent (MJKSZ, 2023). Az Állomány a II. Világháború után csak a Hortobágyon maradt fent kis létszámban, jelenleg is itt van az ország egyetlen kos törzstenyésztete. 1961-ben az Állami Gazdaságok Főigazgatósága (ÁGF) megszüntette a magyar alföldi rackák törzskönyvi ellenőrzését. Polgár Sándor javaslatára az állományt dedomesztikálni szerették volna, különleges szarvalakulása miatt vadászati célokra akarták felhasználni. Hogy a fajta mégsem tűnt el teljesen csak néhány lelkes állattenyésztőnek köszönhető (Veress, et al., 2005) A racka juhok fő ismertetőjegye a szarvalakulás, amely a világon egyedülálló. Két színváltozata létezik, de még jelenleg egy fajtának tekintik (MJKSZ, 2023).

Az Európai Állattenyésztő Szövetség (EÁSZ) 1972-ben Stockholmban rendezett Környezetvédelmi konferenciájának ülésén javaslatot tett a helyi parlagi fajták megőrzésére, feladatuknak tekintették, hogy minden ország helyi fajtáit ismertessék, a kipusztulástól megmentésük (Veress, et al., 2005).

A Magyar Földművelésügyi és Élelmiszerügyi Minisztérium 1973-ban felismerve a genetikai erőforrások fontosságát, hivatalos génmegőrzési programba kezdett, amibe beletartozott több szarvasmarha-, sertés-, juh-, baromfi-, és lófajta fenntartása (Bodó, 1985). Az állatnemesítés célja az emberiség igényeit minél inkább kielégítő világfajták kitenyésztése, ezért homogénebb, nagy termelési potenciállal rendelkező háziállatok kerülnek

előtérbe, a helyi, őshonos fajtákat teljes mértékben kiszorítva a termelésből. Azonban nem lehet tudni, hogy milyen szerepe lehet ezeknek az állatoknak a jövőben, mikor lesz szükség azokra a pillanatnyilag nem fontos génekre, amit ezek az állatok hordoznak (Debnár, 2015). Az ENSZ 1992-ben Rio de Janeiro-i Környezet és Fejlődés Konferenciáján a háziállatokat is a biológiailag védendő értékek közé sorolta.

1993-ban jóváhagyott CXIV. Állattenyésztési Törvény 11. § a háziállatok védelméről rendelkezik. Kimondja, hogy azok a háziállatfajták, amelyek Magyarország természetföldrajzi környezetében alakultak ki, vagy tartásuknak, tenyésztésüknek és hagyománya van hazánkban, nemzeti értéket képeznek (Bodó, 2001).

A Magyar Juhtenyésztők Egyesületének is kiemelt céljává vált a fajta megőrzése *in situ* formában, 2011-re pedig sikerült kidolgozni egy *in vitro* spermamélyhűtési eljárást hortobágyi racka juh esetén (Egerszegi, et al., 2011).

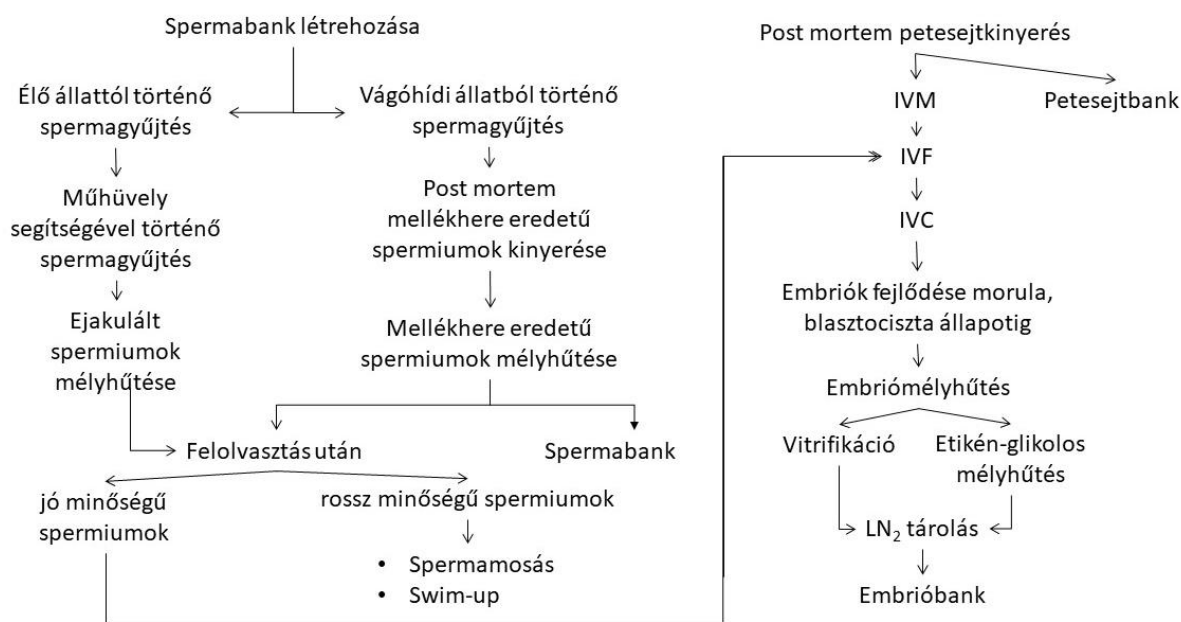
A jelenleg MATE-Kaposvári Campushoz tartozó herceghalmi telephely 2014-ben csatlakozott a „Genetikai erőforrások megőrzése intézkedés keretében a védett őshonos és veszélyeztetett mezőgazdasági állatfajták megőrzése” című programhoz, aminek keretében az őshonos juh fajták *in vitro* génmegőrzésében, a termékenyítő anyag mélyhűtve tárolásában vette ki a részét.

Jelen dolgozatban a hortobágyi racka juh génmegőrzési eljárásoknak az egyéb *in vitro* módszereit, lehetőségeit szeretném bemutatni.

CÉLKITŰZÉSEK

Egy olyan *post mortem ex situ in vitro* génmegőrzési eljárást szerettem volna kidolgozni juh fajon, amely jelentősen képes javítani az eddig alkalmazott *in vitro* embrió előállítás (IVEP) technikákon. Egy természeti katasztrófa, vagy betegség esetén génmentési eljárásokat alkalmazhatunk, pl. *ex situ* gamétabankok (spermium, embrió, petesejt) létrehozásával. Ezeknek a módszereknek a segítségével egy hirtelen állománycsökkenés ellenére is lehetőségünk marad olyan változatok fenntartására, amelyek pl. egy betegség esetén elvesznének (1. ábra).

Őshonos hortobágyi racka juh géntartalékának megőrzési lehetőségei



1. ábra: Őshonos állataink *in vitro* génmegőrzésének lehetőségei

Dolgozatomban azokat a módszereket szeretném bemutatni, amelyek segítségével közelebb kerülhetünk egy hatékonyabb *in vitro* embrióelőállításához.

A kutatás során elvégzett vizsgálatok:

1. Gaméták felhasználásával utód létrehozására az *in vitro* embrióelőállítás nyújt lehetőséget, ehhez viszont egy *in vitro* előállító protokollra van szükség. A szarvasmarha esetén már kidolgozott, a gyártó által juh embriók előállítására is ajánlott IVF Bioscience® médiumokkal történő embrióelőállítási technológiát vizsgáltuk.
2. *Ex situ in vitro* génmegőrzés szempontjából *post mortem* kinyert gamétákkal, petesejtekkel és mellékheréből származó spermiumokkal történő hatékony IVEP technika kifejlesztése juh fajtában a protokoll alapján.
3. Spermium szelekciós swim up eljárás kidolgozása juh mellékhere eredetű spermiumokra.
4. *In vitro* termékenyítési kísérletek elvégzése a módszer hatékonyságának bizonyítása céljából.
5. Az *in vitro* létrehozott juh embriók mélyhűtése fagyasztással és vitrifikációval.

Problémafelvetés:

1. IVF Bioscience® IVEP protokoll betartásával alacsony osztódási százalék volt megfigyelhető az előkísérletek során.
2. A termékenyítéshez használt mellékhere eredetű spermiumok az IVF spermakezelés során a SemenPrep® médiumban történő centrifugálás után jelentős csökkenést mutattak motilitás, progresszív motilitás tekintetében.

2. SZAKIRODALMI ÁTTEKINTÉS

2.1. ŐSHONOS ÁLLATAINK VÉDELME

Napjainkra a Magyarországon élő őshonos állataink *in situ* megőrzése nagyon sok figyelmet, anyagi támogatást kap, köszönhetően annak, hogy felismerték ezeknek az állatoknak a jelentőségét kulturális és szakmai szempontból is. Azonban *in vivo* és *in vitro* hosszú távú eltárolásuknak rendszere még nincs teljes mértékben kidolgozva. Őshonos állataink nagy mértékben vannak kitéve a különböző éghajlati változásoknak, az egyre inkább terjedő fertőző betegségeknek, ezért egyre fontosabbá vált a genetikai erőforrások ilyen formában történő megőrzése. A védett őshonos fajták jelentős genetikai értéket képviselnek, eredeti állapotban való megőrzésük nemzeti érdek és állami feladat (Veress, 1996; Bodó & Veress, 1997). A biológiai sokféleség fenntartásának előtérbe kerülésével, a környezetkímélő gazdálkodással tenyésztésük egyre nagyobb hangsúlyt kap, extenzív tartásra az őshonos fajták felelnek meg leginkább (Oláh, 2002).

Őshonos állataink védelmére az asszisztált reprodukciós technológiák alternatív megoldást jelenthetnek hosszú távú fenntartásuk érdekében.

2.2. ASSZISZTÁLT REPRODUKCIÓS TECHNOLÓGIÁK

Az ART-k elősegítik és támogatják az adott faj szaporodását, az ivarzásszinkronizálást, ivarzásindukciót, a mesterséges termékenyítést és spermamélyhűtést, az embrióátültetést és -mélyhűtést alkalmazzák leggyakrabban. Meghatározó szerepe van az állattenyésztés termelékenységének javításában, genetikailag értékes egyedektől lényegesen több utódot nyerhetünk, mint természetes körülmények között. Segítségül szolgálhat a kihalással fenyegetett vadon élő ritka állatfajok megmentésében, de kulcsszerepet tölthet be az őshonos állatfajtáink megmentésében is (Vass, 2014).

2.2.1. Spermagyűjtési eljárások

A genetikailag értékes állatokból vagy veszélyeztetett fajokból származó, életképes spermiumok kinyerése és mélyhűtése a hím ivarsejtek megőrzése szempontjából fontos módszer. Erre több lehetőség is van, amit az alábbiakban részletesen szeretnék bemutatni.

A spermagyűjtés fajtól függően többféleképpen is elvégezhető. Juhoknál a leggyakrabban alkalmazott technikák a műhüvely, az elektroejakulátor, illetve *post mortem* esetben a mellékhere eredetű spermiumok gyűjtése.

Ejakulált sperma gyűjtése

A spermagyűjtési eljárások közül a műhüvely utánozza leginkább a természetes fedeztetés módszerét. Nagyobb koncentrációjú sperma nyerhető vele, mint az elektroejakulátor használatakor (Wulster-Radcliffe, et al., 2001a; Marco-Jimenez, et al., 2008). Ebben az esetben azonban egy több hetes szoktatási idő szükséges a hím ivarú állatoknak (1.kép).



1. kép: Kosokhoz használt műhüvely.
Készítette: Dr. Kútvölgyi G. Herceghalom (2015)

Spermiumok kinyerése elektroejakulátorral

Az elektroejakulációhoz használt készülék áramforrásból, transzformátorból és rektális szondából áll. A szonda méretét általában az érintett faj határozza meg (2. kép). Az elektroejakulátor lehetővé teszi az alacsony libidójú és nőtényt megugrani képtelen hímeiktől származó sperma gyűjtését is, ezért egy alternatív módszerként használható (Barker, 1958; Sundararaman, et al., 2007; Guiliano, et al.,



2. kép: Kosokhoz (felső) és bikákhoz használt elektroejakulátor (alsó). Készítette: Debnár V. J. Herceghalom (2018)

2008). A juhok elektroejakuláltatása ezzel a módszerrel gyorsabb, kényelmesebb, nagyobb spermamennyiséggel, de alacsonyabb spermiumkoncentrációval jár, azonban az állatnak stresszt okoz, ami állatjóléti szempontból nem a legideálisabb választás (Mattner & Voglmayr, 1962; Salamon & Marrant, 1963; Wulster-Radcliffe, et al., 2001b; Marco-Jimenez, et al., 2005).

Post mortem – vagy kasztrálást követő spermium kinyerés

A *cauda epididymis*ben tárolt spermiumok általában jó minőségűek és elég érettek ahhoz, hogy képesek legyenek megtermékenyíteni a petesejteket (Matas, et al., 2010; Pamungkas, et al., 2012). Miután egy állat elpusztul, csírasejtjei egy bizonyos ideig életben maradnak, így lehetséges lehet egy állat utódainak előállítás a halála után (Hishinuma, et al., 2003). A jó minőségű ejakulátum kinyeréséhez azonban a spermiumgyűjtést és -feldolgozást az állat elhullása után azonnal el kell végezni, mivel az idő és a hőmérséklet jelentős változásokat okozhat a spermiumok életképességében. Martinez-Pastor, et al., (2005); Shakeri, et al., (2008) arról számoltak be, hogy a 48 órán keresztül szobahőmérsékleten tárolt kos spermiumok jobb minőségűek a halál utáni első 24 órában gyűjtötték. Garde, et al., (1998) azt tapasztalták hogy a spermiumok életképessége és *in vitro* fertilitása csökkent, amikor az állat elhullása és a spermagyűjtés pillanata között eltelt idő megnőtt.

Számos tanulmány számolt be arról több állatfaj esetén, hogy a mellékhere több órán, vagy napon keresztül tartó hűtve tárolása után életképes ivarsejteket, termékeny spermiumokat lehetséges kinyerni : szarvasmarha (Martins, et al., 2009), ló (Vieira, et al., 2012), házimacska (Ganan, et al., 2009; Thuwanut, et al., 2010), kutya (Suppawiwat, et al., 2006), kos (Mir, et al., 2012), vadon élő kérődzők (Martinez-Pastor, et al., 2005), teve (Waheed, et al., 2011), bivaly (Barati, et al., 2009) és gímszarvas (Soler, et al., 2003; Malcotti, et al., 2012). Ezek a munkák azt mutatták, hogy a spermium minősége a *post mortem* idő függvényében romlik, és a mellékhere 5 °C körüli tárolása meghosszabbítja a hímivarsejtek túlélését a mellékherékben, így több idő jut a spermiumok feldolgozására.

A mellékhere eredetű spermiumok kinyerése és mélyhűtése elengedhetetlen eszköz az értékes házi- vagy vadon élő állatok genetikai állományának megőrzéséhez. A spermiumok a herékben képződnek (gametogenezis), az érés a mellékherében megy végbe, amikor a sejtek belépnek a mellékhere feji részébe, továbbhaladnak a mellékhere testébe, és végül elérik a farki régiót, ahol az ejakuláció pillanatáig tárolódnak. A farki régióban tárolt spermiumok általában jó minőségűek és magas érettséggel rendelkeznek, így képesek megtermékenyíteni a petesejteket. A mellékhere kedvező környezetet biztosít a spermiumok termékenyítőképességének, több hétig tartó fenntartásához (Bertol, 2016). A mellékheréből származó spermiumok visszanyerése egy utolsó lehetőség az elhullott állatok ivarsejtjeinek felhasználására, a kihalás által fenyegetett állatok fenntartására (Tittarelli, et al., 2006).

A legtöbb tanulmányban a heréket 5°C-os hűtési hőmérsékleten tartják feldolgozásig (Egerszegi, et al., 2012), ami lelassítja a sejtlebontási folyamatokat, ezzel növelve az ivarsejtek életképességének tartamát (Martins, et al., 2009). Az alacsony hőmérséklethez képest (4–6 °C) a szobahőmérséklet (18–22 °C) összehasonlítása során azt találták, hogy a tárolási hőmérséklet nagyban befolyásol néhány paramétert, mint az akroszóma integritását, a spermiumok mozgékonyágát, koncentrációját és morfológiáját (Lone, et al., 2011).

2.2.2. Spermafeldolgozás

Közvetlenül a spermagyűjtés után a sperma makroszkópiusan értékelhető szín és térfogat alapján, később a laboratóriumban a spermiumok mozgékonyágának, az ondó pH-jának és koncentrációjának mikroszkópos értékelése következik. A spermamintában lévő mozgó spermiumok százalékos arányának vizuális becslése valószínűleg a leggyakoribb laboratóriumi elemzés. Ez a módszer nagyon hasznos lehet, bár egyetlen fontos spermatulajdonságot értékel és ki van téve az emberi szubjektivitásnak. (Moce & Graham, 2008).

Minden állatfajnál a spermát testhőmérsékleten gyűjtik, ezért törekedni kell ennek megtartására, egy hirtelen hőmérsékletcsökkenés hidegsokkot eredményez (Hafez, 1987). A sperma hűtése során törekedni kell a fokozatos hűtésre, mivel az ondó túl gyors, 30 °C és 0 °C közötti hűtése halálos stresszt indukál a hímvarsejtben. A spermiumsejtek 5 °C-ról kiindulva gyors, 15-60 °C/perc sebességgel való mélyhűtése elfogadható túlélési arányt mutat. A hűtési sebességnek azonban elég lassúnak kell lennie ahhoz, hogy a víz ozmózis útján hagyja el a sejteket, megakadályozva a sejten belüli jégképződést (Mazur, 1984). A kos spermiumok középrésze és farki része különösen sérülékenynek bizonyult, ha a hűtés lassabban történik (Kumar, et al., 2003).

Mellékherei spermiumok esetén a gyűjtést követően nem történik azonnali feldolgozás, a heréket, illetve a mellékherét el kell juttatni a megfelelő laboratóriumba további feldolgozásra, akár az állat elhullási helyétől, akár a vágóhídról. A szállítás ebben az esetben szobahőmérsékleten történik, majd az ejakulált spermával megegyező módon történik az 5 °C-ra történő hűtése (Mujitaba, et al., 2022).

Különböző módszerek a mellékhere eredetű spermiumok életképességének javítása érdekében

Mellékhere eredetű minták során a szikepenge segítségével történő szeletelésnél sok törmelék és vér kerül a mintába, ami rontja a spermiumok életképességét, ezért szükséges ezek eltávolítása olyan módszerekkel, amelyek nem okoznak kárt a spermiumok mozgékonyágában. A megfelelő és hatékony tartósítás elengedhetetlen eleme a spermiumok jövőbeni felhasználásának, ezért a különböző pufferek hozzáadása, majd ezekkel történő centrifugálása egy jó alternatíva lehet.

Egy összetett vizsgálat során megnézték a különböző médiumokban történő eltartás és centrifugálás hatását. A kísérlet során a Tris- citric-acid- fruktóz és -glükóz (TCF, TCG), illetve a Nátrium- citrát- fruktóz és -glükóz (SCF, SCG) hígítókkal végzett vizsgálatok során kimutatták, hogy ezek használatával közvetlenül a mellékhere eredetű spermiumok kinyerése utáni hígítással és centrifugálással egy jó mozgékonyággal rendelkező, tisztított mintát kaphatunk. A különböző hígítók közül kiemelhető a TCG puffer, ami mélyhűtés és felolvasztás után magasabb spermium motilitást eredményezett a többi hígítóval összehasonlítva (Ahmed, et al., 2019). Ebben a vizsgálatban a mintákat 10 percig 855x g sebességgel centrifugálták.

A centrifugálás az egyik leggyakoribb spermiumelőkészítési módszer, aminek fejlesztése egyre fontosabbá válik a mesterséges termékenyítés és az IVF számára. Egy olyan sebesség

kidolgozására van szükség, amivel a sejtek károsodását csökkenteni tudjuk, elkerülve ezzel a nagy spermiumvesztességet (Neila-Montero, et al., 2022).

Több ilyen kísérletet végeztek az elmúlt évek során, azonban a mai napig nincs meghatározva a legkevesebb sejtkárosodással járó centrifugálási erő. A 3000x g, vagy annál nagyobb erővel 10 percig tartó centrifugálás szobahőmérsékleten a spermiumok mozgási karakterisztikájában változást figyeltek meg (Neila-Montero, et al., 2021). A minta 1200x g vagy az alatti sebesség 10 percen át tartó centrifugálása során (Neila-Montero, et al., 2022) nem tapasztaltak látható károsodást a sejtekben.

2.2.3. Az ondósejtek mozgási paramétereinek értékelése digitalizált eljárással (CASA rendszer)

Az ondó minőségének rutinszerű bírálatára használt módszerek között a digitalizált motilitás-vizsgálórendszerek nagymértékben elterjedtek a világban, már szinte nincs olyan szaporodásbiológiával foglalkozó laboratórium, ahol ne lenne megtalálható. Ezek a rendszerek jól szemléltetik a sejtek életképességét, használatuk gyors és egyszerű, ezen felül rögzítik és tárolják a különböző mozgási paramétereket, kizárják a szubjektív bírálat pontatlanságát (Horváth, et al., 2006b). Az első ilyen számítógép az 1980-as évek közepén már a humán laboratóriumokban is megjelent. Előnye, hogy a fáziskontraszt objektívvel ellátott mikroszkóp lehetővé teszi, hogy a spermium világos, a háttér sötét látótérben tudjon megjelenni. A spermiumok mozgását a mikroszkóp látócsövére helyezett digitális kamera közvetíti a számítógép programjának, ahol a rendszer érzékeli, végigköveti minden hímivarsejt mozgását a látótérben a kiindulási és a végpont között, a végén pedig értékeli ezeket a mozgásokat az alábbiak szerint:

- Motilitás (%), progresszív motilitás (%),
- VCL: A hímivarsejt sebessége a ténylegesen megtett teljes mozgási útvonalára számolva ($\mu\text{m/s}$).
- VSL: A hímivarsejt sebessége mozgásának kiindulási és végpontja közötti távolságra számolva (progresszív sebesség) ($\mu\text{m/s}$).
- VAP: A hímivarsejt sebessége mozgásának átlagolt útvonalára számolva ($\mu\text{m/s}$).
- DAP: A hímivarsejt ténylegesen megtett útvonalának és a mozgásának kiindulási és végpontja között mért távolságának (nettó) az átlagolt hosszúsága (μm).
- DCL: A hímivarsejt által ténylegesen megtett út hosszúsága (μm).

- DSL: A hímivarsejt által megtett egyenes útvonal a mozgás kiindulási és végpontja között (μm).
- LIN: A hímivarsejt ténylegesen megtett mozgási útvonalának az egyenestől számított eltérése (%).
- ALH: A fej oldalirányú kitéréseinek átlagos nagysága (μm).
- BCF: A fej kilengésének átlagos nagysága (Hz).
- WOB: A hímivarsejt teljes mozgási útvonalának az átlagolt mozgási útvonaltól számított eltérése (%).
- STR: A hímivarsejt átlagolt mozgási útvonalának az egyenestől számított eltérése (%).
- ALH: A fej oldalirányú kitéréseinek átlagos nagysága (μm).

2.2.4. Kos sperma mélyhűtése

Az ivarsejtek mélyhűtése az ART fontos eszközévé vált, különösen akkor, ha a donorok közötti távolság – a hím és női ivarsejtek- időben és térben eltérő. A sperma hosszú távú megőrzése akkor is fontos, ha a jövőben IVEP-et és/vagy mesterséges megtermékenyítést kell végezni (Merlo, et al., 2008; Barbas & Mascarenhas, 2009). A mélyhűtést követő sperma minősége azonban mindig korlátot jelent, mivel a mélyhűtés és felolvasztás során számos folyamat zajlik, amelyek potenciálisan károsíthatják a hímivarsejtet, gyakran csökkenti a termékenységet. A mélyhűtés befolyásolja a spermiumok tulajdonságait is, mint például a mozgékonyt és a plazmamembrán integritását, következésképpen csökkenti a spermiumok túlélőképességét. Úgy tűnik, hogy a kos hímivarsejt membránjainak sajátos összetétele van, ami érzékenyebbé teszi őket a mélyhűtéssel szemben, ezért nehezebb a kossperma mélyhűtése, mint más haszonállatfajok esetében. Ennek oka lehet, a kosspermiumok sejthártyájának magasabb telített zsírsavaránya és alacsonyabb foszfolipid aránya, a többi állatfajhoz viszonyítva (Abdelhakeam, et al., 1991; Salamon & Maxwell, 1995b; Ollero, et al., 1998; Byrne, et al., 2000). A hímivarsejt túlélőképességét a mélyhűtési eljárások és az azt követő felolvasztás is befolyásolja. Bár a juhokban a spermiumsejtek 40-60%-a meg tudja őrizni mozgékonyt a fagyasztás és felolvasztás után, a spermiumoknak csak 20-30%-a marad termékenyítőképes (Watson, 2000; Salamon & Maxwell, 2000).

2.2.5. A kossperma mélyhűtés módszerei

A juhoknál széles körben alkalmazott ivarsejt mélyhűtési módszerek a szabályozott lassú mélyhűtés és a vitrifikáció (Papadopoulos, et al., 2002).

Lassú mélyhűtés

A lassú mélyhűtés technikájában a minta elég gyorsan lehül ahhoz, hogy megakadályozza a hűtés okozta károsodást, ugyanakkor elég lassú ahhoz, hogy lehetővé tegye a sejtek vízvesztését, intracelluláris jégképződés nélkül. A lassú mélyhűtési technikát kísérő „sejtkiszáradás” potenciálisan előnyös a hímivarsejtek túlélésére, míg a gyors mélyhűtési sebesség nagyobb valószínűséggel sejthalált okoz. A lassú fagyást a stabilabb termodinamikai egyensúly is jellemzi. Alacsony koncentrációban használják a krioprotektáns anyagokat, amelyek általában kémiai toxicitással és ozmotikus stresszel járnak együtt (Byrne, et al., 2000; Arav, et al., 2002; Hiemstra, et al., 2005; Barbas & Mascarenhas, 2009). Kimutatták, hogy mind a lehülés, mind a felengedés sebessége hatással van a plazmamembránra, így a hímivarsejt túlélésére is.

Vitrifikáció

A vitrifikáció egy gyors mélyhűtési módszer, amelyet az oldat alacsony hőmérsékleten történő szilárdulásának neveznek jégkristályok képződése nélkül. Ez magában foglalja a gyors hűtési sebességet és a krioprotektánsok anyagok (CPA) magas koncentrációját, amelyek csökkentik a jégkristályok képződését a sejtben, és minimalizálják a hidegsokkot (Vajta, 2000; Barbas & Mascarenhas, 2009). A vitrifikáció 30-50% CPA-t igényel a tápközegben, szemben a lassú mélyhűtési technika 5-10%-val (Dinnyés, et al., 2007). Bár úgy tűnik, hogy a vitrifikáció jobb eredményeket ad a felolvasztás után, a legtöbb emlős spermiumsejtje rendkívül érzékeny a CPA magas koncentrációjára, és alacsony az ozmotikus toleranciájuk. A nagyobb térfogatú sejtekben, szövetekben vagy szervekben a hőátadás azonban túl lassú ahhoz, hogy lehetővé tegye a vitrifikációt a kristályosodás veszélye nélkül. Előnyös a nagy térfogatok, például sperma és szövetek mélyhűtése lassú hűtési sebességgel. Ezért a vitrifikáció általában nem túl sikeres a sperma mélyhűtésére (Arav, et al., 2002; Isachenko, 2003; Hiemstra, et al., 2005).

2.2.6. A mélyhűtött sperma minőségét befolyásoló tényezők

A sperma mélyhűtésében több fontos tényező is szerepet játszik, amelyek befolyásolják a spermiumok minőségét és életképességét. A kos sperma minősége romlik a hűtés, mélyhűtés, felengedés és a krioprotektáns szerek hozzáadása következtében (Fernandez-Santos, et al., 2006), nagyon érzékenyek a fagyasztási folyamat során fellépő szélsőséges hőmérsékleti változásokra. A spermiumsejtek mélyhűtésére használt eljárásokról kimutatták, hogy a spermium plazmamembránjának károsodását is okozzák (Marco-Jimenez, et al., 2005).

2.2.7. Spermakezelési eljárások

Védőanyagok (CPA-k)

Az extenderek védőképességgel rendelkező hígítóközegek, amelyeket a spermiumok hosszabb ideig tartó fenntartására használnak (Hafez, 1987; Royere, et al., 1996), a hímivarsejteket energiaforrással látják el, megvédik a sejteket a hőmérséklet okozta károsodásoktól, és megfelelő környezetet biztosítanak a spermiumok túléléséhez. CPA használata nélkül 5 °C-on a sejtek életképességében 14%-os csökkenést mutatott, azonban a motilitást nem befolyásolta szignifikánsan, CPA használatával azonban az életképesség 51%, a mozgékonyság 62%-ot mutatott. A mélyhűtés és felolvasztás komolyabb változásokat idéz elő különböző hígítók használata nélkül, amelyek a mozgékonyság teljes elvesztéséhez is vezetnek (Ollero, et al., 1998; Paulenz, et al., 2002; Dorado, et al., 2007). A hígítók lényege, hogy segítse a spermium sejtek membrán épségét a mélyhűtési és felengedési folyamat során (Soylu, et al., 2007).

Az extenderek általában membrán permeábilis, vagy nem permeábilis CPA-t, sókat, cukrokat és antibiotikumokat tartalmaznak, utóbbival szabályozva a mikrobiális szennyeződések elszaporodását. A cukrok biztosítják a spermiumok energiaszubsztrátját (Hafez, 1987; Berlinguer, et al., 2007). A hígítókhoz puffereket is adnak a sperma pH-értékének fenntartása érdekében. A lipidek hozzáadása egy töltőanyaghoz leküzdí a hidegsokk kezdeti káros hatását, egy fő lipid forrás a tojássárgája. A tojássárgáját tartalmazó hígítókat széles körben alkalmazzák (Maxwell & Salamon, 1993; Marti, et al., 2003), azonban vírusfertőzések vagy allergiás reakciók lehetséges forrása lehet. Számos tanulmányt végeztek a kos ondó mélyhűtésére szolgáló különféle hígítók és protokollok kidolgozására, a termékenységi eredmények azonban mindig alacsonyabbak maradtak, mint a friss spermával történő termékenyítés során (Woelders, et al., 1997; Stanic, et al., 2000).

Mélyhűtéshez használt krioprotektánsok

Ahhoz, hogy a sperma mélyhűtése sikeres legyen, a krioprotektív adalékanyagoknak jelen kell lenniük (Cunningham, 1999). A krioprotektánsok feladata, hogy a mélyhűtési eljárás során a sejteket megvédjék a sejtvíz károsodásától és a sokkhatástól. Ezeket a reagenseket a mélyhűtő és vitrifikáló oldatok elsődleges komponenseinek is nevezik (Moore & Bonilla, 2006; Pereira & Marques, 2008). Ezek a krioprotektáns anyagok elengedhetetlenek a mélyhűtés során, de ezek akár alacsony koncentrációban is ártalmasak lehetnek (Fernandez-Santos, et al., 2006). Az alkalmazott CPA-k típusa különböző állatfajokban eltérő lehet (Viveiros, et al., 2000). A krioprotektánsok hozzáadása és eltávolítása szintén fontos szerepet játszik a sperma

mélyhűtésében, így például a krioprotektánsok moláris arányban történő hozzáadása és eltávolítása jelentős, de átmeneti ozmotikus stresszt jelenthet a hímivarsejt plazmamembránjára. A glicerin védőtulajdonságainak felfedezése óta a leghatékonyabb védőszer az intracelluláris víz fagyáspontjának csökkentésében (Royere, et al., 1996), ezért ma már széles körben alkalmazzák, annak ellenére, hogy ozmotikus stresszt vált ki (Watson, 2000; Morrier, et al., 2002). Ha a spermát glicerin nélküli hígítókban mélyhűtik, olyan intracelluláris kristályok képződnek, amelyek a felolvasztás során károsíthatják a spermium szerkezetét, azonban, ha a hígítószerkezhöz történik a hozzáadása, korlátozza toxicitást. A glicerin hozzáadása a lehűtött kosspermához általában csökkenti a spermiumok mozgékonyágát és az akroszóma integritását (Anel, et al., 2003; Kumar, et al., 2003; Sonmez & Demirci, 2004). A glicerin mellett más védőszereket is használnak, mint a dimetil-szulfoxidot (DMSO) és etilénlikolt (EG). Feltételezhető, hogy egy adott krioprotektáns alkalmazásának sikere fajspecifikus. A jelenleg használt krioprotektánsok közül a glicerin a legalkalmasabb CPA a juhsperma mélyhűtésében. Azt találták, hogy a glicerinnek nincs hatása a mélyhűtött-olvasztott spermiumok minőségére a motilitás és életképesség alapján (Morrier, et al., 2002; Salamon & Maxwell, 2000).

2.2.8. Felolvasztási eljárás

A mélyhűtött sperma felolvasztása történhet különböző oldatokban, mélyhűtéskor használt hígítójában, vagy fiziológias sóoldatban is. A sperma felolvasztásakor az oldatokon kívül a hőmérsékletet és az időt is figyelembe kell venni a sejtkárosodás minimalizálása érdekében. A felolvasztás gyorsan, vagy lassan is végrehajtható. Érdekes megfigyelés, hogy abban az esetben, ha gyors kiolvasztás történik (70 °C 5 másodpercig), magasabb lesz a felolvasztás utáni spermiummozgás és membránintegritás, mint lassú felolvasztás esetén (35 °C-on 12 másodpercig) (Soderquist, et al., 1997).

2.3. SPERMIUMSZEPARÁLÁSI ELJÁRÁSOK

A spermiumok termékenyítőképességének meghatározása nagy jelentőséggel bír a későbbi tenyésztés során. Az előkészítési technika segítségével jó életképességű, és megfelelő motilitású termékenyítő anyag hozható létre. A spermiumok kapacitációja, vagy apoptotikus állapota, is nagyban befolyásolja a petesejtek termékenyítőképességét (Martí, et al., 2013).

Megállapították, hogy a spermiumok ondóplazmával való hosszan tartó tárolása káros hatással van a spermiumok működésére, de védelmet biztosít bizonyos káros körülményektől, mint

például az oxidatív stressztől. Az ejakulált sperma előregedett spermiumokat és sejttörmelékeket is tartalmaz, amelyek csökkentik a spermiumok túlélését (Saleh & Agarwal, 2002).

2.3.1. Spermamosás

A spermiumok elválasztását az ondóplazmától, a spermamosást ma már rutinszerűen alkalmazzák a különböző reprodukciós eljárások során. A módszer során az ondóplazmát eltávolítják az, majd újraszuszpendálják a spermiumokat egy megfelelő médiumban. Mélyhűtött, majd felolvasztott, vagy spermahígítóval kezelt minták esetén pedig a különböző krioprotektáns anyagoktól mentessé lehet tenni a termékenyítő anyagot. A legtöbb ilyen eljárás egy szűrést, vagy egy centrifugálási lépést tartalmaz (Martí, et al., 2013). A módszer problémája, hogy ekkor nem történik spermiumszelekció, az elhalt, vagy rendellenes sejtek is megmaradnak, ami káros a spermiumok életképességére (Morrell & Rodriguez-Martinez, 2011), ezért ezt a módszert akkor érdemes használni, ha megfelelő a minta minősége.

2.3.2. Swim-up, felúsztatásos módszer

A swim up (SU) számos variációban létezik, mindegyik a mozgékony spermiumok azon képességén alapszik, hogy a sejtek egyik szuszpenzióból a másikba mozognak. Az egyik legrégebben használt spermium elválasztási módszer, az első megjelent publikációk után egy évvel már szarvasmarha IVF során történő felhasználásának az első eredményeiről is beszámoltak (Parrish, et al., 1986). 2013-ban kos spermával egy összehasonlító vizsgálatot végeztek, ahol az életképességet, a kapacitációs állapotot, illetve az apoptotikus állapotot is felmérték (Martí, et al., 2013). Eredményeik alapján a legjobb értékeket minden vizsgálat során a SU módszernél találták, motilitás esetén például a SU volt az egyetlen, ahol a nyers mintához képest az eljárás növelte az életképes spermiumok arányát. A többi kipróbált módszer során, (Percoll sűrűséggradiens centrifugálás, szacharózos mosás és szűrés) némi spermiummembrán elváltozást találtak, kismértékben csökkentve a spermiumok életképességét (Martí, et al., 2013).

A SU az egyik leggyakrabban használt módszer a spermiumok előkészítésére. Az eljárás során az ejakulátumot a tápközeg alá kell rétegezni, testhőmérsékletet biztosítva, így meghatározott idő alatt a spermiumok motilitás alapján szétválnak mozgó, illetve nem mozgó frakcióra. A jó motilitással rendelkező sejtek a felső frakcióban helyezkednek el (Berger, et al., 1985). Az eljárás időtartamára különböző időtartamokat írtak le (Han, et al., 2016; Parrish, et al., 1995; Somfai T., 2002; Bodó, 2003), átlagosan 30-60 perc a leggyakrabban alkalmazott idő.

2.4. *IN VITRO* EMBRIÓELŐÁLLÍTÁS (IVEP)

A genetikai anyag mélyhűtésének fontos feladata a genetikai erőforrások megőrzése, akár *in vivo*, akár *in vitro* formában (Sharkey, et al., 2002; Andrabi & Maxwell, 2007). Az eljárás magában foglalja a spermiumok, petesejtek, embriók vagy szomatikus sejtek megőrzését. A sperma mélyhűtése és a mesterséges termékenyítés szintén számos előnnyel járhat az állattenyésztés számára, a módszer során fontos géneket őrizhetünk meg a jövőbeni felhasználáshoz. Egy kiemelkedő értékmérővel rendelkező apaállat esetén ennek segítségével lehetőség van a sperma nagy távolságú szállítására, nagy számú anyaállat termékenyítésére hosszú ideig, vagy az év különböző évszakaiban történő termékenyítésére is (Gillan, et al., 2004; Peris, et al., 2004).

A genetikai erőforrás során nagy figyelmet kell fordítani a petesejtek, embriók megőrzésére, hosszú távú fenntartására, vagy recipiensbe ültetésére. A kinyerésükre alkalmas petefészkekhez legolcsóbban, illetve a legnagyobb számban a vágóhidakon lehet hozzájutni, azonban ezek a petesejtek fejlődési kompetenciájuk, genetikai felépítésük és életkoruk tekintetében igen változatosak (Bilodeau-Goeseels & Panich, 2002).

Az *in vitro* embrióelőállítás (IVEP) egy többlépcsős rendszer, ami a következő lépésekből áll: Közvetlenül a tüszőkből kinyert petesejtek *in vitro* érlelése (*in vitro* maturáció, IVM), az *in vitro* termékenyítés (*in vitro* fertilizáció – IVF) és a termékenyített petesejtek *in vitro* tenyésztése (*in vitro* kultiváció – IVC) blasztociszta stádiumig.

Juhok esetében az IVEP-el kevesebb előrelépést sikerült elérni az elmúlt években a technika számos hiányossága miatt, mint például az *in vitro* érlelés, a megtermékenyítés és a tenyésztési eljárások tekintetében. Az elmúlt 30 év kutatási erőfeszítése ellenére az eredmények még mindig kiszámíthatatlanok, emiatt kereskedelmi forgalmazásuk sem tudott megkezdődni. A spermiumok hatékonyabb mélyhűthetőségére és mélyebb embriófiziológiai kutatásokra lenne szükség (Paramio & Izquierdo, 2014).

2.4.1. Petesejt gyűjtési technikák

A petesejtek kinyerésének módja befolyásolhatja az IVEP hatékonyságát (Katska-Ksiazkiewicz, et al., 2007). A levágott állatokból származó petesejtek kinyerésére különböző módszereket alkalmaznak, azonban oociták élő állatokból is kinyerhetők. A levágott juhoknál általában a petefészkek felszeletelését/feldarabolását vagy tüszőaspirációt alkalmaznak a petesejtek kinyerésére (Wani, et al., 2000). Élő állatokból a petesejt-kumulusz komplexeket laparoszkóp segítségével tüszőaspirációval (LOPU) lehet izolálni.

Petesejt kinyerés petefészek szeletelés módszerével

A szeletelés olyan módszerre utal, amelynek során a petefészkeket gyűjtő táptalajt tartalmazó Petri-csészébe helyezik. Ezután a petefészek teljes felületén egy sebészeti szikepenge segítségével bemetszést végeznek (Pawshe, et al., 1994; Wani, et al., 2000; Wang, et al., 2007). A petesejtek ezt követően a tüszőkből a Petri csészében lévő táptalajba kerülnek. A juhok esetében ellentmondásos eredmények születtek a petefészek feldarabolásával kapcsolatban, nagyobb számú petesejtet eredményez, azonban a keletkező törmelék megzavarja a petesejtek mikroszkópos keresését, ami a begyűjtött petesejtek elvesztéséhez is vezethet (Wang, et al., 2007; Wani, et al., 2000).

Oocita aspiráció

A petesejt kinyerésének ez a módszere azt jelenti, hogy az összes látható petefészek tüszőjét egy eldobható fecskendőhöz csatlakoztatott injekciós tű segítségével szívják le. A folliculáris petesejt aspirációját meglehetősen nehéz feladat kiskérődzők esetében, ahol a kis méretű petefészekben átlagosan két darab elfogadható minőségű cumulus oocita komplex (COC) van petefészekenként, amit aspirációval sikeresen ki lehet nyerni (Pawshe, et al., 1994; Cognie, 1999). A leszívott folliculáris folyadékot egy kereső Petri-csészébe teszik át a petesejt mikroszkópos kereséséhez.

2.4.2. A petesejt minőségét befolyásoló tényezők

Az oocita-kinyerési módszer célja a petefészekként nyert jó minőségű petesejt teljes számának maximalizálása. A kinyert petesejtet életképes embriók előállítására kell felhasználni úgy, hogy fejlődési kompetenciájukat megőrizzék az *in vitro* érlelés során (Wani, et al., 2000; Shirazi, et al., 2005; Morton, et al., 2008).

A petesejt minőségét tehát az határozza meg, hogy a petesejt képes-e elérni a nukleáris és citoplazmáris érettséget, képes-e megtermékenyülni és a fejlődő embriókból később lesznek-e életképes utódok (Duranthon & Renard, 2001; Hussein, et al., 2006; Sirard, et al., 2006). A petesejt minősége összefügg a donor állat életkorával, szezonalitással, a tüszőfejlődési stádiummal és a petesejt érleléséhez használt táptalajjal (Camargo, et al., 2006; Keskinetepe, et al., 1994).

2.4.3. A donor életkora

Az anyajuhok életkora, amelyből a petesejtet szeretnénk kinyerni meghatározza a petesejt fejlődési kompetenciáját. A prepubertás bányók esetében a petesejt gyűjtése már 4 hetes

korban megkezdődhet, a legtöbb tüsző a petefészken már 4-6 hetes kor között jelentkezik (Armstrong, et al., 1997) és a maximális tüszőszámot is ebben a korban érik el. Ez a szám fokozatosan csökken egy stabilan alacsony számra, amikor az anyajuhok eléri a pubertás kort. A bárány szuperovuláció hatása akkor a legjobb, ha a petefészek felszínén lévő tüszők száma elérte a maximumot (Koeman, et al., 2003; Chen, et al., 2008). A pubertás előtti állatokból származó petesejtek azonban csökkent fejlődési kompetenciát mutatnak, összehasonlítva a felnőtt kérődzőkből származó petesejtekkel (Khatir, et al., 1996; Morton, 2008). Amikor a petesejtek prepubertás bárányokból származtak, csak a 29%-a fejlődött a blasztociszta stádiumig, szemben a felnőtt anyajuhoktól gyűjtött petesejtek 39,3%-os fejlődési arányával (Morton, et al., 2005). Juhoknál is előfordulhat polispermia, de – figyelmen kívül hagyva a polispermia lehetőségét-, a pubertás előtti petesejtekből származó blasztociszták hajlamosak egy nappal később fejlődni, mint a felnőtt petesejtekből származó blasztociszták (O'Brien, et al., 1997).

2.4.4. A petefészek tüszőmérete

A tüsző fejlődési szakasza és a petesejt növekedése egyenesen arányos. Beszámoltak arról, hogy a tüszőméret nagymértékben befolyásolja az ovuláció során nyert petesejtek minőségét és a kapott embrió minőségét (Sirard, et al., 2006). A petesejtek tüszőn belüli növekedése általában lassú folyamat, amelyben a petesejteknek a theca és a granulosa sejtekkel való kölcsönhatás révén kell kompetenciát szerezniük a meiotikus éréshez (Camargo, et al., 2006; Krisher, 2004). Ez az ovulációt megelőző fejlődési szakaszokban történik, egy olyan folyamaton keresztül, amelyet általában petesejtek kapacitálódásának neveznek (Hyttel, et al., 1997), ahol ezen idő alatt a petesejt érési változásokon megy keresztül (Elder & Dale, 2000). Juhoknál 2-6 mm méretű tüszők általában teljesen kifejlett petesejteket tartalmaznak, amelyek jó kompetenciát mutatnak az *in vitro* sejtmag érésben. A petesejtek fejlődési kompetenciája egyértelműen összefügg a petesejtek átmérőjével, fejlődési kompetencia növekedése érhető el, ha 8 mm-nél nagyobb átmérőjű tüszőket használunk (Crozet, et al., 1995; Hyttel, et al., 1997; Hendriksen, et al., 2000; Lonergan, et al., 2003). A növekedési fázis során a petesejtek átmérője több mint 120 μm -re nő (Hyttel, et al., 1997). Tanulmányok kimutatták, hogy a 110 μm -nél kisebb átmérőjű petesejtek még növekedési fázisban lehetnek (Fair, et al., 1995), ami azt is jelentheti, hogy a petesejtek kevésbé képesek a megtermékenyítés után fejlődni, ezért alacsonyabb blasztocisztaképződést eredményeznek. Az ilyen kis petesejtek hajlamosak bizonyos kromoszóma-eltérésekre is az érés során, ami hátráltatja a további fejlődést (Armstrong, 2001; Lechniak, et al., 2002). A petesejt átmérője egyenesen arányos a tüsző átmérőjével, a

petesejtek tovább növekednek, még a 10 mm-nél nagyobb átmérőjű tüszőkben is (Arlotto, et al., 1996). Az embrionális fejlődésben nemcsak a tüszők mérete fontos, hanem a petefészek felszínén lévő tüszők száma is. Kimutatták, hogy a felszínen 8 vagy több tüszővel rendelkező juh petefészkek nagyobb százalékos osztódást és blasztociszta arányt eredményeznek, mint a 4, vagy kevesebb tüszővel rendelkező petefészkek (Mossa, et al., 2006).

2.5. IN VITRO ÉRLELÉS (IVM)

A petesejteket morfológiai jellemzők alapján szubjektív bírálat alá vetik, ahol csoportosítják és szelektálják (Katska-Ksiazkiewicz, et al., 2007). Az IVM-hez használt petesejteket általában a következő kritériumok alapján választják ki: tüszőméret, citoplazmatikus megjelenés, a petesejtek körüli kumuluszsejtek (COC-k) megjelenése. A petesejtek körüli kumulusz sejtréteg vastagsága meghatározza a petesejtek meiotikus kompetenciáját. A vastagabb kumulusz sejtrétegek azt jelzik, hogy a corona radiata sejtek elegendőek ahhoz, hogy a petesejt befejezze a sejtmag érését (Schoevers, et al., 2007). A petesejtek nukleáris és citoplazmatikus érésének fontos jelzése tehát a petesejteket körülvevő kumuluszsejtek rétegei (Kidson, 2005). Ennélfogva a kumulusz expanzió fontos jelzés a petesejtek *in vitro* érési sebességének felmérésére (Gupta, et al., 2005). A kumuluszsejtek támogatják a spermium behatolását a petesejtbe úgy, hogy megakadályozzák a zóna megkeményedését (Schoevers, et al., 2007). A kumulusz kiterjedése segíti a spermiumkapacitációt, a megtermékenyülést és az embriófejlődést (Chen, et al., 1990).

Az *in vitro* petesejtek érése röviden magában foglalja egyrészt a COC-k mesterséges eltávolítását a tüszőkből, másrészt a tenyésztést, hogy elérje a metafázis II.-t. Mindazonáltal az *in vitro* érett petesejteknek csak kis hányada mutat teljes fejlődési potenciált a megadott korig (Gilchrist & Thompson, 2007). A petesejt érésének számos aspektusa van, beleértve a sejtmagi és citoplazmatikus érést. A sejtmagi érés a meiózist és a folyamat újraindulását jelenti a metafázis II. stádiumba, míg a citoplazmatikus érés a petesejtek citoplazmatikus kapacitációjával kapcsolatos érési eseményeket is magában foglalja (Kidson, 2005). Az *in vitro* petesejtek érlelésében azonban a mai napig nagyon sok hiányosság van még, különösképpen kiskérődzők esetén (Shi, et al., 2009).

IVM-hez használt tápközegek

Az IVM eljárást napjainkra minden állatfajon külön standardizálták, amire többek között magának a technológiának a költségcsökkentése miatt volt szükség. Így az IVM metódus drága összetevőit kevésbé drága kémiai összetevőkkel helyettesítik (Gupta, et al., 2005). Általában a

petesejt IVM-hez használt táptalajok általánosan összetett készítmények, amelyeket eredetileg szomatikus sejtek és szövetek tenyésztésére terveztek. A táptalaj készítményeket úgy tervezték, hogy megfeleljenek a szomatikus sejtek anyagcsere-szükségleteinek, különösen a sejtvonalak hosszútávú fenntartásához, nem pedig az érő COC-k összetett és dinamikus követelményeinek. Ezért szükséges olyan tápközeg-készítmények meg-, vagy újratervezése, illetve a piacon újonnan megjelent speciálisan erre a célra kidolgozott tápközegek használata.

A folliculáris folyadék összetétele eltér az általánosan használt IVM-médiától, és leginkább a glükóz koncentrációjában, amely a COC-k fő energiaszubsztrátja (Gilchrist & Thompson, 2007). Az IVM során a petesejtek és a környező kumulusz-sejtek funkcionális egységet alkotnak, ezért fontos figyelembe venni a COC tápanyagigényét az *in vitro* érési táptalaj javítása érdekében (Sutton, et al., 2003). A legtöbb emlős IVM alap táptalajt szérummal és hormonokkal egészítik ki (Pawshé, et al., 1996; Wang, et al., 1998).

2.6. IN VITRO TERMÉKENYÍTÉS (IVF)

Az IVF eljárások nagyon hasonlóak mind a természetesen ovulált, mind a tüszőből leszívott petesejtekben (Tajik & Shams Esfandabadi, 2003). Az eljárást általában olyan közegben hajtják végre, amelyet kifejezetten úgy alakítottak ki, hogy utánozza a petevezető környezet- és biokémiai összetevőit, és elősegítse a spermiumok kapacitálódását. A petevezető szimulálásához megfelelő környezetet ad, ezzel biztosítva a petesejtek érését és a termékenyítéshez szükséges feltételeket (Elder & Dale, 2000). Azonban gyakran nehéz hasonló feltételeket biztosítani a petevezető és a méh szorosan szabályozott környezetében fellépő élettani állapotok esetén (De La Torre-Sanchez, et al., 2006).

A hímivarsejtek csak azután érik el teljes termékenyítési kapacitásukat, hogy a női reproduktív traktusba eljutnak. Ezeknek a sejteknek további fiziológiai változásokkal járó döntő folyamaton kell keresztülmenniük, mielőtt behatolnának a zona pellucidába, és egyesülnének a petesejttel (Katska-Ksiazkiewicz, et al., 2004; Camargo, et al., 2006). Ezeket a változásokat spermiumkapacitációnak nevezik. A kapacitáció lehetővé teszi, hogy a spermiumsejtek normális akroszóma reakción menjenek keresztül a megtermékenyítés előtt. Néhány korai IVF-kísérlet sikertelen volt, mivel a hímivarsejtek nem voltak kapacitívak (Hafez & Hafez, 2000; Graham & Moce, 2005; Camargo, et al., 2006), a sperma mélyhűtésével azonban a kapacitáció korábban indukálódik, így a hímivarsejtek megkerülnek bizonyos normális folyamatokat (Morrier, et al., 2002). Az IVF-hez használt táptalajnak biztosítani kell a spermiumok mozgékonyágát és kapacitálódását, a két ivarsejt összeolvadását, majd az embrionális fejlődés

megindulását. Ez nem mindig van így, mivel a két ivarsejt szükségletei és metabolikus tevékenységei nem azonosak, ezért fontos, hogy megfelelő táptalajt használjunk a spermium-előkészítéshez (Izquierdo, et al., 1998).

A legtöbb termékenyítő közegben heparin szerepel, mivel indukálja a spermiumok kapacitálódását. A heparin kötődik a spermiumhoz és változásokat indukál a spermium intracelluláris környezetében, ezáltal Ca_2^+ -felvételt, valamint az intracelluláris szabad kalcium és az intracelluláris pH növekedését eredményezi (Lane, et al., 1999). A heparin megnövekedett koncentrációja befolyásolhatja a képződött blasztociszták százalékos arányát. Más szerek, például koffein és penicillamin, hipotaurin és epinefrin keveréke szintén bekerülhet a termékenyítő táptalajba, a spermiumok mozgékonyágának serkentésére és élettartamuk meghosszabbítására. A szarvasmarha szérum albumin (BSA) egy másik kiegészítő az IVF tápközegben, amely felhasználható a spermiumok *in vitro* kapacitálódásának javítására. A heparin és a BSA együttes hatása a juhok termékenyítési arányára azonban kevésbé dokumentálható. A koffein azonban csökkenti a juhokban a friss spermával elért termékenyítési arányt (Izquierdo, et al., 1998; Wani, 2002).

2.6.1. IVF-hez használt termékenyítőanyag

A kapott termékenyítési arány a felhasznált spermától függően ingadozik. Az IVF során a felhasznált sperma lehet friss, mélyhűtött, szexált vagy mellékherei eredetű. Minősége általában a hígítás és mélyhűtés mértékével romlik. A közvetlenül a spermavétel után elfogadhatónak ítélt sperma hígítás után csökkentheti a spermiumok mozgékonyágát (Sugulle, et al., 2006). A mélyhűtött spermát friss spermával összehasonlítva az látható, hogy a mélyhűtés csökkenti a termékenységet, a felolvasztás után alacsonyabb életképességet mutat. A friss hímivarsejtek nagyobb petesejtkötő képességet mutattak, mint a mélyhűtött-olvasztott spermiumsejtek (Watson, 2000; Niu, et al., 2006). Több haszonállatfajban is születtek utódok pl. szarvasmarha, sertés és juh ivar szerint szelektált spermiumok felhasználását követően, *in vitro* termékenyítéssel és embriótranszferrel (Catt, et al., 1996; Johnson, et al., 2000; Fry, et al., 2004).

Számos tanulmány azonban alacsonyabb vemhességi arányról számolt be az ivar szerint szelektált spermával történő termékenyítés után, mint a nem szelektált spermiumokkal (Hollinshead, et al., 2002; Seidel & Garner, 2002; Wheeler, et al., 2006). A spermium ivarmeghatározására használt DNS-festékek bizonyos citotoxikus hatást fejtenek ki, amely

hatással van a termékenyülésre, az embrionális fejlődésre és az utódok állapotára (Hollinshead, et al., 2004).

Post mortem mellékherei spermiumok felhasználása történik. Az eljárás nagyon fontos lehet olyan esetekben, ahol a genetikai tartalékok kinyerése más módon már nem történhet meg. Ilyen eset lehet például egy genetikailag értékes, esetleg veszélyeztetett állat örökítőanyagának hosszútávú megőrzése, fenntartása. A mellékheréből származó spermiumok termékenyítő képességének eredménye hasonló a természetes módon vett spermiumokéhoz (Kaabi, et al., 2003).

2.7. IN VITRO TENYÉSZTÉS (IVC)

Az *in vitro* embriótermelés utolsó lépése a feltételezett zigóták tenyésztése, hogy elérjék a blasztociszta stádiumot a termékenyítés utáni 6-8. napon (Gardner, et al., 1994). Ez az időszak van a legnagyobb hatással a blasztociszta minőségére, az IVC sikere különböző tényezőktől függ, mint például a pH érték, O₂, CO₂ arány, aminosavak, lipidek fehérjék mennyisége. A megfelelő környezettől történő bármilyen változás vagy eltérés embrionális leálláshoz vezethet (Paramio & Izquierdo, 2014).

Hagyományos tápközegben az embriók 8-16 sejtes stádiumig képesek fejlődni, azután leállnak, ezért ezekhez a médiumokhoz kiegészítést kell adni. Kezdetben petevezetőből származó hámsejteket adtak a táptalajhoz (Gandolfi & Moore, 1987), azonban a fertőzésveszély és a kétes minőség miatt és az oxidatív stressz elkerülés érdekében antioxidánsok, mint például ciszteamin került a médiumba (De, et al., 2011). Különböző táptalajokat sikeresen alkalmaztak a kiskérődzők embrióelőállításának fejlesztésére, mint például a TCM 199 (Wani, et al., 2012), vagy B2 (Katska-Ksiazkiewicz, et al., 2007) táptalaj, de a legszélesebb körben használt közeg a szintetikus petevezető folyadék (SOF) (Tervit, et al., 1972). Tervit és munkatársai (1972) elsőként számoltak be juh zigóták sikeres tenyésztéséről a blasztociszta stádiumig *in vitro* SOF táptalaj felhasználásával, amely a juh petevezető folyadékának összetételén alapult. Ez a táptalaj aminosavakkal kiegészítve támogatja a kérődzők embrionális fejlődését. Úgy alakították ki, hogy utánozza a petevezető folyadékot, egy összetett közeg, amely a vérből és a hámsejtekből származó aktív szekrécióból származik. A termékenyítés után 72 órára ebbe a folyadékba helyezett juh embriók 8-16 sejtes állapotba képesek fejlődni. Ebben az időszakban az embrionális fejlődést a folyadék összetételének enyhe változásai szabályozzák (Tervit, et al., 1972). A SOF-on kívül más médiumok is használhatók, pl. TCM 199, Hams-F10 és Tyrodes táptalaj (Walker, et al., 1996; Wani, 2002; Camargo, et al., 2006; Cox & Alfaro, 2007). Az

alkalmazott táptalajok nemcsak az embrionális fejlődést, hanem a mélyhűtés utáni embrió túlélést is befolyásolják (Nedambale, et al., 2004).

2.8. EMBRÓK MÉLYHŰTÉSÉNEK LEHETŐSÉGEI

Az *in vitro* embriók tenyésztése az elmúlt évek során nagy fejlődésen ment át, a mélyhűtési technikák fejlődésével lehetőség nyílt az értékes gének széleskörű elterjedésének, lehetőséget teremtve ezzel a veszélyeztetett fajták, fajok genetikai megőrzésére is (Falchi, et al., 2022).

Azonban a mai napig a mélyhűtési technika széles körű használata még viszonylag alacsony, sikeres alkalmazása kiskérődzőkben nagymértékben függ az alkalmazott technikától (Baril, et al., 2001).

A sikeres juhembriók mélyhűtésére az elmúlt évek alatt két jól működő eljárást dolgoztak ki, a lassú mélyhűtést (etilén-glikol) és a vitrifikációt. A szakirodalom az alkalmazott módszertől függetlenül kimutatta, hogy az embriók túlélési aránya mindkét esetben általában hasonló (Gibbons, et al., 2011).

Lassú mélyhűtés

Az egyik legelterjedtebb mélyhűtési technika, amit már sok éve használnak spermiumok hosszú távú eltárolása során. Előnye, a csökkent sejttotoxicitás az alacsony krioprotektáns koncentráció, azonban lehetővé teszi jégkristályok képződését, amelyek sejtkárosodáshoz vezethetnek (Bair, et al., 2020). A módszert eredetileg *in vivo* eredetű embriók számára fejlesztették ki, *in vitro* eljárás során alacsonyabb túlélési arányt eredményeztek, ettől függetlenül a lassú mélyhűtés továbbra is a legszélesebb körben használt technológia (Santos-Neto, et al., 2017).

Először 1977-ben írtak sikeres etilén-glikolban mélyhűtött patkányembriók túléléséről (Miyamoto & Ishibashi, 1977), majd juhokkal végzett vizsgálatok során kimutatták, hogy az EG jobb fagyvédő szer az eddig használt DMSO, vagy glicerin, alacsonyabb toxicitással rendelkezik, mint ez előbb felsoroltak (Tervit & Gold, 1984).

Az eljárás lényege, hogy az embriókat tartalmazó tápközeg vízben gazdagabb, mint az intracelluláris közeg, így a fagyás elején az első jégkristályok az extracelluláris közegben keletkeznek, aminek következtében csökken a sejten belüli jégképződés. A lassú mélyhűtés megpróbálja fenntartani az egyensúlyt azoktól tényezőktől amelyek károsodást okozhatnak, mint az ozmotikus sérülés, a jégkristályok képződése, a krioprotektánsok toxikus hatása (Vajta, 2000).

Vitrifikáció

A vitrifikáció egy viszonylag új eljárásnak tekinthető az embriómélyhűtés gyakorlatában, a különböző fajokra, különböző vitrifikációs eljárásokat alkalmaztak (Donnay, et al., 1998; Baril, et al., 2001; Martino, et al., 1996; Kuwayama & Kato, 2000), azonban az eljárás alapjaiban a módszerek megegyeznek. A védőanyagok kombinációját nagy koncentrációban tartalmazó fagyasztó oldatban mélyhűtik az embriókat egy gyors hűtési sebességgel, a sejtbe bejutó krioprotektív anyagok és a gyors (-196 °C) hűtése eredményeképpen az embriók nincsenek kitéve a jégkristályok képződésnek, hanem üvegszerű anyagot képezve megszilárdulnak (Naitana, et al., 1997). Azonban az oldatban található krioprotektáns magas koncentrációja miatt az eljárás nagymértékű toxicitással jár (Vajta, et al., 1998). A probléma kiküszöbölése érdekében csökkentették az oldat térfogatát, növelték a hűtés sebességét (Papis, et al., 2000; Kuwayama, et al., 2005; Martino, et al., 1999). A Cryotop rendszer fejlesztésével sikerült egy módszert megalkotni, ahol az embriókat egy vékony polipropilén lemezre helyezve, rendkívül kis térfogatú (<0,01µl) vitrifikációs oldat elegendő a mélyhűtéshez (de Oliveira Leme, et al., 2016).

Az IVEP segítségével létrehozott embriókat különböző fejlődési szakaszban vitrifikálhatjuk, 4, 8, 16, morula, vagy blasztociszta fejlődési stádiumban, azonban a mélyhűtési eljárás mindegyik stádiumban megegyező (Shirazi, et al., 2010).

2.9. EMBRIÓÁTÜLTETÉS

Az eddig a szakirodalomban leírt eljárások utolsó lépése az embrióátültetés az egyik legnagyobb jelentőséggel bíró asszisztált reprodukciós technika, amit világszerte széles körben alkalmaznak.

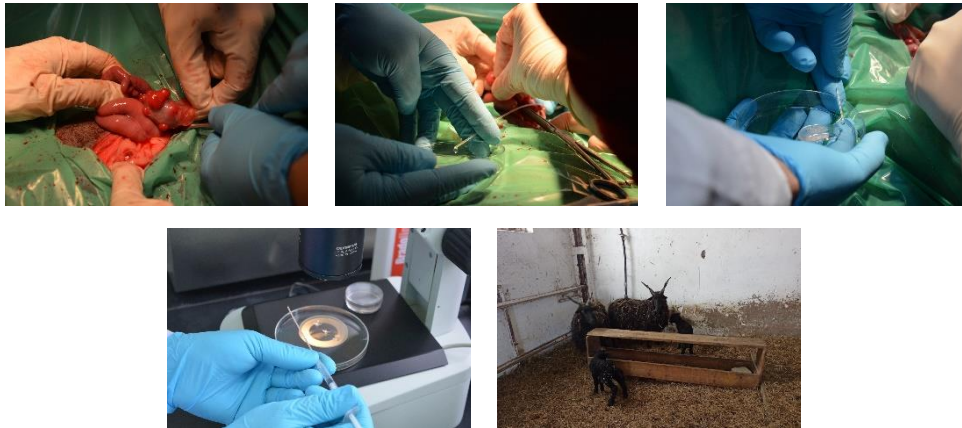
Előnyeit és hátrányait (Cseh & Dohy, 2003) az alábbiak szerint fogalmazták meg:

- A módszer segítségével a genetikai előrehaladás felgyorsítható, a nagy tenyésztékű nőivarú egyedektől nagyobb számú utód nyerhető ki.
- Megkönnyíti, biztonságossá és gazdaságossá teszi a nemzetközi tenyészállat kereskedelmet, nincs szállítási veszteség, állategészségügyi kockázat, akklimatizációs problémák elkerülhetők.
- Azonban az eljárás rendkívül költséges, a szuperovuláció során még napjainkban is az 1970-es évek elején kialakított eljárás van használatban.

Magyarországon az 1980-as évektől vannak már gyakorlatban alkalmazott sikeres juh embrióátültetések (Cseh, et al., 1984; Cseh & Seregi, 2007), 1995-ben megszülettek az *in vitro* fertilizációval előállított az első bárányok (Cseh, et al., 1995), majd több évtizedes szünet után 2009-től ismét előtérbe került az eljárás, 3 év alatt 430 db juh embrió került beültetésre recipiensekbe (Vass, 2014).

Az IETS (International Embryo Technology Society) adatai alapján az elmúlt évben (2022) világszinten az előző évhez képest növekedés figyelhető meg; juh embrióátültetés *in vivo* mélyhűtött formában 620 db, *in vitro* előállított embriók esetében pedig 1489 esetben volt (IETS, 2022).

Sikeres racka embrióátültetés történt 2020-ban Herceghalomban (3. kép), ahol a donorból kinyert embriók recipiensbe kerülve élő utódokat eredményeztek (Szóbeli közlés).



3. kép: Embriók kinyerése, recipiensekbe ültetése és az eljárásnak köszönhetően megszületett utód.. Készítette: Debnár V.J., Herceghalom (2020-2021)

3. A VIZSGÁLATOK MÓDSZEREI

Munkámat a MATE- ÁTI PÁTÁB t.sz. Szaporodásbiológiai, Embriológiai és Génmegőrzési csoport Kaposvári Campus kihelyezett telephelyén, Herceghalmon végeztem.

A különféle táptalajok és médiumok pontos összetétele a Mellékletek c. fejezetben található meg.

Az egykori AIK ÁTHK 1991. óta rendes tagja volt a Magyar Juhtenyésztők és Kecsketenyésztők Szövetségének (MJKSZ), törzstenyészetet tartott fent a kísérleti Modelltelepén, ahol hortobágyi fekete racka tenyésztését is végezte 2005-től. Az Intézet 2014-ben csatlakozott a „Genetikai erőforrások megőrzése intézkedés keretében a védett őshonos és veszélyeztetett mezőgazdasági állatfajták megőrzése” programhoz, aminek keretében az őshonos juh fajták *in vitro* génmegőrzésében, a termékenyítő anyag mélyhűtve tárolásában segítette a génmegőrzési pályázatot.

3.1. EJAKULÁLT SPERMA KINYERÉSE, MÉLYHÚTÉSE, ÉRTÉKELÉSE

Az ejakulált sperma gyűjtését 2014-2017 között végeztük a fenti őshonos juh génmegőrzési pályázat keretein belül, ahol 2015-től mint BSc szakdolgozó segítettem be a munkafolyamatokba, majd 2016-tól, mint alkalmazott a mai MATE herceghalmi telephelyén.

3.1.1. Ejakulált sperma gyűjtése, feldolgozása

A pályázati kiírásnak megfelelően, az MJKSZ által kijelölt egyedeket (cikta, cigája, tejelő cigája, hortobágyi racka) az akkori NAIK-ÁTHK telephelyére szállították be a különböző tenyészetekből, ahol 30 napos karantén időszak után elkezdődött a kosok betanítása a spermavételre, ami átlagosan 2-3 hetet vett igénybe (4.kép).



4. kép: Kosok spermavételre szoktatása műhüvely segítségével. Készítette: Debnár V.J., Herceghalom (2016)

A betanítási idő után az ejakulátumot egy komplex andrológiai vizsgálat követte, ahol a volumen, koncentráció, motilitás, élő-elhalt sejtek aránya, és morfológiai vizsgálat történt. A mélyhűtésre alkalmas paraméterek az alábbiak voltak:

- Minimum 75% motilitás
- Kevesebb, mint 15% összes morfológiai defektus
- Minimum 2 milliárd spermium/ml

A sikeresen nyert ejakulátumot a laboratóriumban további vizsgálatok követték. Megnéztük a spermium tömegmozgást, ahol 1-5-ig tartó skálán pontoztuk, vizsgáltuk a mennyiséget pipetta segítségével (Gilson, USA), a koncentrációt spektrofotométerrel (IMV, Accucell, Franciaország). A mozgó sejtek százalékos arányát 100x-os hígításban értékeltük fáziskontraszt mikroszkóppal (Olympus BX-51) 200x-os nagyításban.

A koncentrációt $300 \times 10^6/\text{ml}$ élő sejt arányban állítottuk be Andromed® (Minitübe, Tiefenbach, Németország) hígítóval. Végül a hígított spermát 0,5 ml-es műszalmákba töltöttük, és PVP (poly-vinyl- pyrrolidon) por segítségével zártuk.

A szalmák jelölése egyedileg történt:

Állomás kódja _kos ENAR száma _termelés dátuma

A szalmákat fokozatosan 5°C-ra hűtöttük és 2 órán keresztül ekvibráltuk, majd 8 percre nitrogéngáz fölé helyeztük a mintákat, végül folyékony nitrogénbe mártottuk (Salamon & Maxwell, 2000).

A termékenyítőanyag minőségének ellenőrzése céljából, mélyhűtési alkalmanként egy szalmát (minimum 1 napos -196°C-os tárolást követően) felolvasztottunk 37°C-os vízfürdőben 30 másodperc alatt, majd Andromed® hígítóval 10x-ére hígítva 10 percig ekvibráltattuk. Az inkubálást követően a mozgó sejtek arányát szubjektív motilitásvizsgálattal és CASA rendszerrel értékeltük. Emellett élő-elhalt spermiumok arányának meghatározását Kovács-Foote szerinti festéssel (Kovács & Foote, 1992) készített keneten 1000x-es nagyításban (Leica MD50) mikroszkóppal végeztük.

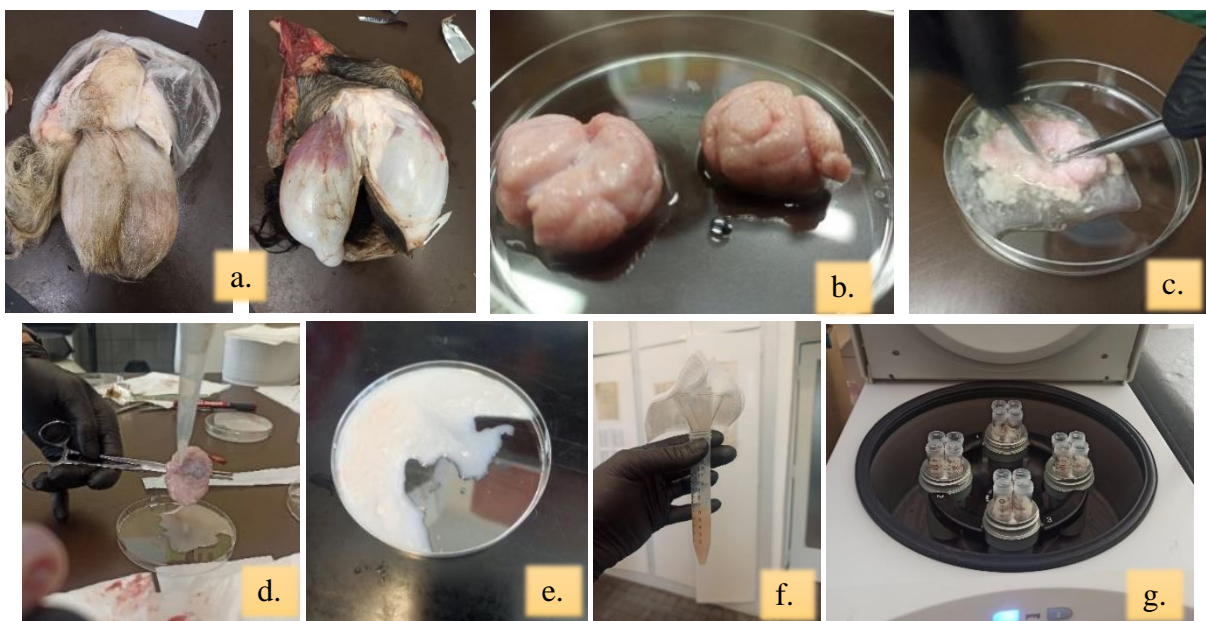
Azokat a mintákat tekintettük megfelelő minőségűnek, amelyek felolvasztás után minimum 40% motilitással rendelkeztek. Azokat a kosokat, amelyek egymást követő 3 mélyhűtési időpontban 30%-nál alacsonyabb motilitási értékekkel rendelkeztek, a programból kizártuk.

3.2. MELLÉKHERE EREDETŰ SPERMIMUMOK MÉLYHŰTÉSE

A termékenyítésekhez szükség volt mellékhere eredetű spermiumokra, amiket különböző vágóhidakról sikerült beszerezni. A vágást követően a heréket a scrotummal együtt szállítottuk a laboratóriumba, így egyedileg tudtuk mélyhűteni a mintákat. A szállítás 5°C-on történt minden esetben (Kaabi, et al., 2003).

3.2.1. Mellékhere eredetű spermiumok feldolgozása

A szervek feldolgozását szobahőmérsékleten végeztük. A tasakból kipreparált herékről az azokat borító közös hüvelyhártya falis lemezét lefejtettük, a mellékherét szikével elválasztottuk a heréktől és lemetsztük a mellékherék farki részét. Ollóval és érfogóval óvatosan lefejtettük a közös hüvelyhártya zsigeri lemezét, a vérereket igyekeztünk minél alaposabban eltávolítani. Ezt követően a szobahőmérsékletre előmelegített 2 ml TCF hozzáadásával Petri-csészébe helyeztük a szervdarabot és azon kereszt és haránt irányú bemetszéseket, vágásokat végeztünk. A spermiumok 30 perces kiúztatásával kapott szuszpenziót egy steril-gézlapon segítségével



5. kép: Mellékhere eredetű spermiumok kinyerés vágóhidról beérkezett mintákból. Készítette: Debnár V.J., Herceghalom (2023). a.: Herék beérkezése a laboratóriumba, a hereborék eltávolítása. b.: Mellékhere farki része., c.: Szeleteléses spermiumkinyerés. d.: Mellékhere átmosása az összes spermium kinyerése érdekében. e.: A kinyert spermium Petri-csészében. f.: Spermium átszűrése steril gézlapon. g.: Spermium centrifugálás

átszűrtük és egy 15ml-es centrifugacsőbe gyűjtöttük (Egerszegi, et al., 2012). Ezt követően minden mintát centrifugáltunk 880x g (rcf) fordulaton, 10 percig (Mujitaba, et al., 2022) (5. kép), majd a felülúszót leszívva a mintát először tömegmozgás alapján értékeltük, később a spermium koncentrációtól függően 50-100 x-os hígítási arányban szubjektív motilitást végeztünk. Minden minta esetén szubjektív elbírálás is történt, a jó minőségű minta színét,

szagát, állagát tekintve. Jó minőségűnek tekintettük, amelyek színe gyöngyházfehér, jellegzetesen fanyar szagú és tejszerűen folyik.

Mennyiségi meghatározás 100-1000 μ l vagy 100-5000 μ l mérési tartományú Gilson (USA) pipettával történt, egymáshoz viszonyítva állapítottuk meg a minták színét, ahol további feldolgozásra csak a gyöngyházfehér minták használtuk, az eltérő színűek a továbbiakban ki lettek zárva.

Mozgékonyosság meghatározása mikroszkópos vizsgálattal történt. A nyers mintából 10 μ l mennyiséget vettünk ki és hígítottuk 1:99 arányban Andromed® (Minitübe, Tiefenbach, Németország) hígítóval. Az értékelés szubjektív, fénymikroszkópos meghatározás alapján történt, ahol 0-100%-os tartományban értékeltük, OlympusBX-51 binokuláris mikroszkóp segítségével, 200x-os nagyításban, fáziskontraszt optikát használva.

Koncentráció meghatározására Makler-féle (Sefi Medical Instruments Ltd., Izrael) spermiumszámláló kamrát használtunk, itt hasonlóan a fent leírtakhoz, 1:99 arányban hígítottuk a mintát. A minta hígítását ebben az esetben desztillált vízzel végeztük a könnyebb leszámolhatóság érdekében. A kamra üvegére 10 μ l mennyiségű mintát cseppentettünk és 3-4 x 10 négyzetet számoltunk le, átlagoltuk, majd a térfogat és a hígítás figyelembevételével kiszámoltuk az eredeti minta koncentrációját.

3.2.2. Mélyhűtés és felolvasztás

A koncentráció meghatározása után Andromed® (Minitübe) mélyhűtésre alkalmas hígítóval beállítottuk a megfelelő koncentrációt, ami esetünkben 200x10⁶/ml össz sejtszám volt. A szobahőmérsékletű spermiumokhoz Andromed® védőanyagot lassan csepegtetve adtuk hozzá, majd 250 μ l-es műszalmába töltöttük, a végét pedig PVP (poly-vinyl- pyrrolidon) porral zártuk. Betöltés után a műszalmákat fektetett állapotban fokozatosan hűtöttük 5°C-ra 120 perc alatt, az idő lejáratá után folyékony nitrogén fölé helyeztük 4 cm-re, 8 percig, majd folyékony nitrogénbe



6. kép: Spermiumok műszalmába töltése, majd folyékony nitrogénben való eltárolás. Készítette: Debnár V.J. Herceghalom (2023). a.: Az előkészített, feliratozott műszalmák. b.: A 200x 10⁶/ml koncentrációra beállított minták nitrogéngőz fölött. c.: Nitrogénben eltárolt minták

merítettük (Egerszegi, et al., 2012). Végezetül a tároló kaniszterekbe, majd tároló konténerbe helyeztük (6. kép).

A mintákat minimum 24 órás -196°C -os nitrogénben való tárolás után olvasztottuk fel, ekkor 37°C -os vízfürdőbe merítettük a szalmákat 30 másodpercre. A mintákat Eppendorf® csövekbe tettük, majd Andromed hígítóval történő 1:2 arányú elegyítés után 10 percig pihentettük. Első lépésben szubjektív, százalékos meghatározással bíráltuk a mozgékonyaságukat, majd CASA vizsgálattal megállapítottuk a mozgékony spermiumok arányát, a progresszív motilitási százalékot, a spermiumok sebességének változásait VAP ($\mu\text{m/s}$), VCL ($\mu\text{m/s}$), VSL ($\mu\text{m/s}$), STR (%), LIN (%), WOB (%), ALH (μm) és a BCF (Hz) értékeket.

3.3. SPREMIUMSZEPARÁLÁSI ELJÁRÁSOK

3.3.1. Spermamosásnál alkalmazott tápközegek összehasonlítása

2021. és 2022.-ben végzett mellékhere eredetű IVEP kísérleteink során a legtöbb problémát az IVF során végzett jó minőségű termékenyítőanyag használata okozta. Hiába volt megfelelő minőségű a mélyhűtött- felolvasztott mintánk, a termékenyítések mégsem a vártnak megfelelően alakultak. Több lehetséges probléma került előtérben, mint például a nőivarú állatok szezonalitása, a nem megfelelő ivarérettség (túl fiatal, vagy túl idős), esetlegesen valamilyen szaporodásbiológiai probléma miatt kerültek az állatok a vágóhídra. A különböző felvetődött problémák közül én a hímivar, a spermiumok problémájának kizárásával szerettem volna kezdeni, ezért először a spermamosó protokollt teszteltem mellékhere eredetű spermiumokkal, kontrollként pedig ejakulált mintát használtam. Ahhoz hogy a kísérlet során azonos kezdeti motilitással és progresszív motilitással rendelkezzenek, a SU kísérletekhez a spermiumszelektáló hatás vizsgálata végett a kiselejtezett ejakulált mintákat használtam. Második lépésben pedig egy olyan swim-up módszert szeretnénk volna kidolgozni, ami elősegítheti a későbbi *in vitro* embrióelőállítás, hogy akár egy értékes állat rosszabbul sikerült spermafagyasztását is fel lehessen használni a későbbiekben.

A spermamosást az IVF- BIOSCIENCE protokollban leírt, a gyártó által forgalmazott SemenPrep elnevezésű tápközeggel végeztem. A kísérlet során a mennyiségeken, centrifugálási időben és egyéb a protokoll szerint megadott utasításokon nem változtattam.

Mosás lépései:

- A kísérletekhez összesen 6 ml 38°C hőmérsékletű médiumot használatam.

- Első lépésben a folyékony nitrogénben elhelyezett mélyhűtött spermaminták felolvasztása és vizsgálata történt a fentebb leírtak alapján (3.1.1. fejezet).
- 15 ml- es centrifugacsőbe 4 ml médiumot helyeztem, majd hozzáuszpendáltam a natív mintát, és 5 percig 300x g (rcf) fordulaton centrifugáltam.
- A felülúszót leszívtam annyira, hogy az alján kb. 350 µl spermiumdús minta maradjon, majd hozzáadtam 2 ml tápközeget és ismételten centrifugáltam 300x g (rcf) fordulaton 5 percig.
- CASA vizsgálattal értékeltem a kapott minta motilitását és egyéb mozgással kapcsolatos értékeit.

3.3.2. Swim-up módszer

Első lépésben a kísérleteket ejakulált 2014. és 2017. között mélyhűtött cikta, cigája, hortobágyi racka, és tejelő cigája kosok felolvasztott mintáival kezdtem, a vizsgálatok végeztével kezdtem a mellékhere eredetű spermiumok swim-up vizsgálatát. Mindkét esetben 5 ismétlést végeztem.

A SU során 3 különböző tápközeget használtam: a STALP, USTALP és IVFTALP. A médiumok közötti eltérés a BSA mennyiségek és frakciók között volt (fraction V. és Fatty Acid Free), (ld. Mellékletek fejezet).

A vizsgálatokat során 30 és 60 perces SU vizsgálatokat végeztem ugyanazokkal a felolvasztott mintákkal, az ismétlések során különböző kosok mélyhűtött mintáit használtam fel.

3.3.3. A vizsgálati minták felolvasztása, CASA vizsgálata ejakulált és mellékhere eredetű spermamintákkal

A műszalmákat folyékony nitrogénből 37°C-os vízfürdőben olvasztottam ki 20 másodperc alatt, majd 1,5 mL-es centrifugacsövekbe tettem. Minden vizsgálat során egyszerre 5 darab 250µl-es szalmát olvasztottam fel, ezek összessége adta egy kísérleti mintámat.

10 perc 37°C-os pihentetés után az ejakulátum szubjektív motilitás, majd CASA vizsgálata következett, ahol feljegyeztem a különböző kezdeti értékeket olvasztási utáni közvetlen vizsgálat (F0), felolvasztás után eltelt 30 perc (F30) és 60 perc (F60), ezek voltak a kiindulási értékek. Feljegyzésre került a mozgékony spermiumok aránya, a progresszív motilitási százalék, a spermiumok sebességének különböző változásai VAP (µm/s), VCL (µm/s), VSL (µm/s), STR (%), LIN (%), WOB (%), ALH (µm) és a BCF (Hz). A mintákat 1:9 arányú hígításban vizsgálatam (a natív mintákból 10µl átpipettáztam egy másik centrifugacsőbe, amit 90 µl Andromed® hígítóval kevertem).

3.3.4. A különböző swim up módszerek összehasonlítása

A natív mintákat 6 egyenlő részre osztottam és a már korábban előinkubált (min. 2 óra) médiumok alá rétegeztem egy üvegkapilláris segítségével.

1. Különböző médiumokkal történő swim-up menete:

- 1 és 3 ml 38°C hőmérsékletű STALP, USTALP, illetve CO₂-dal dúsított közegben előinkubált (5.5-6.5% CO₂, 21% O₂) IVFTALP médium a kísérletek megkezdése előtt 15ml-es centrifugacsövekbe töltöttem.

- 150 µl spermamintákat a médiumok aljára pipettáztam, ügyelve, hogy a minta ne keveredjen össze (7. kép).

- Ezután a mintákat 2 különböző termosztátba helyeztem, mivel az IVFTALP médium igényei a Hepes hiányában más körülményeket igényel.

- A 3-3 db minta 30 és 60 perces inkubálása 38°C-on történt.

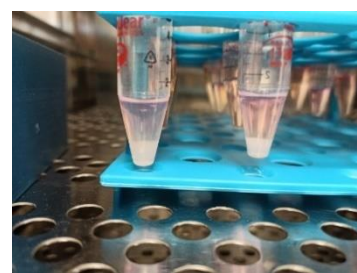
- Az idő lejártá után 850 µl mennyiségű felülúszó leszívása következett.

- A felülúszót a már előinkubált 3 ml 38 °C-os STALP, USTALP és IVFTALP médiumba szuszpendáltam.

- A centrifugacsöveket Parafilm-mel (Alcan, Chicago) zártam, és ejakulált spermaminták esetén 300x g (rcf), mellékhere eredetű spermiumok esetén 880x g (rcf) -en történő 10 perces centrifugálás következett.

- Utolsó lépésként a felülúszó eltávolítása történt, ahol 150 µl üledéket hagytam.

A mintákat ezután ismét szubjektíven és CASA segítségével is értékelttem, összehasonlítva a kezdeti 1:9 arányban hígított natív mintákkal. A vizsgálat végén minden esetben koncentrációsámítást végeztem.



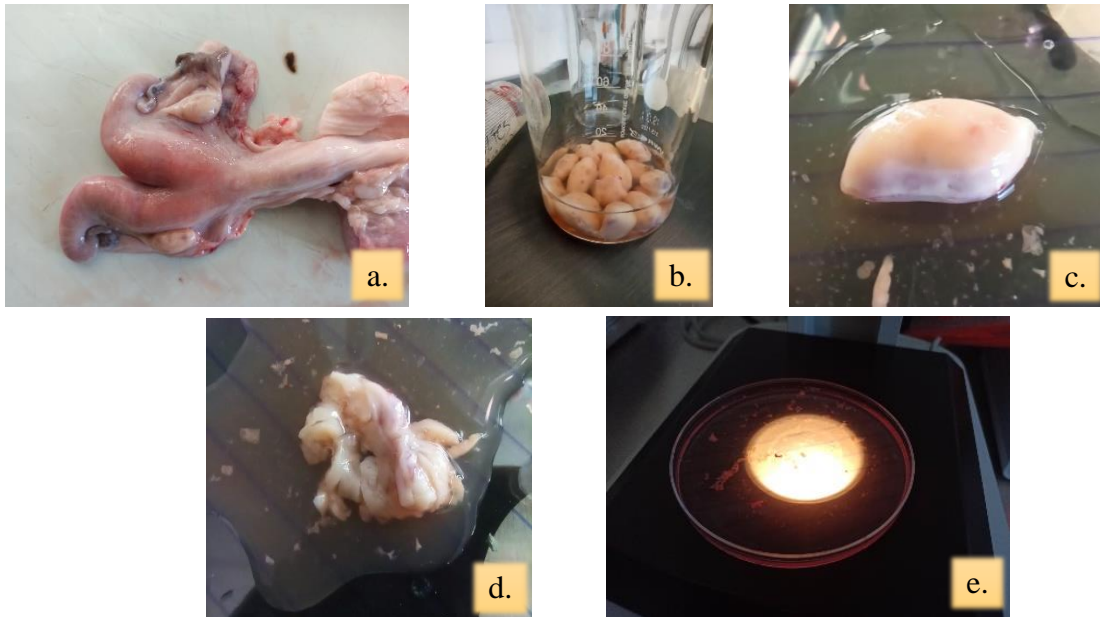
7. kép: TALP médiumban az alárétegzett spermium. Készítette: Debnár V.J., Herceghalom (2023)

3.4. JUH PETESEJTEK *IN VITRO* ELŐÁLLÍTÁSA

Az *in vitro* embrielőállítás során a Semen prep spermamosó tápközegen kívül mindent az IVF BIOSCIENCE® által megadott protokoll leírása alapján végeztem.

A petesejtek gyűjtésének módja

A kísérlethez felhasznált 14 darab racka anyáktól származó petefészkeket 2023. márciusában a herceghalmi vágóhídról gyűjtöttem, ahonnan aztán közvetlen feldolgozásra kerültek a laboratóriumban. Első lépésben a petefészkeket átmostam PBS (Gibco, BRL, Grand Island, New York) oldatban, majd a petefészkekről eltávolítottam a különböző egyéb szövetmaradványokat egy steril olló, szikepenge, illetve csipeszek segítségével. A petesejteket



8. kép: Teljes női nemi traktus feldolgozása. Készítette: Debnár V.J., Herceghalom (2023). a.: Vágóhídról beérkezett női szerv. b.: Kivágott petefészkek PBS oldatban. c.: Petefészkek Petri- csészében. d.: Petefészkek szeletelése. e.: Petri- csészében lévő petesejtek keresése mikroszkóp alatt.

ezután szeletelési technikával gyűjtöttem (Wani, et al., 1999). Petri (Falcon®) csészébe helyezve a petefészkek teljes felületét bevagdaltam függőleges, illetve merőleges irányba egy sebészeti szikepenge segítségével, majd az egész petefészket alaposan átöblítettem OPU (IVF Bioscience, UK)+10% FCS-t (Sigma, F2442) tartalmazó oldattal. Sztereomikroszkóppal (Olympus SZX12, Japán) a COC-kat mikroszkóposan megvizsgáltam, kiválogattam a petesejteket és morfológiai megjelenésük alapján osztályoztam (8.kép).

A komplett, kompakt kumuluszrétegekkel és egyenletesen granulált citoplazmával rendelkező COC-kat választottam ki a további munkára. A szabálytalan szemcsés citoplazmával rendelkező, denudálódott petesejteket nem tekintettem érlelhetőnek, ezeket kihagytam a további munkából. A kinyert, elfogadható minőségű petesejteket egy vékony üvegapilláris segítségével egy BO-WASH (IVF Bioscience, UK) médiumot tartalmazó Petri csészébe helyeztem. A petesejteket 4 különböző csoportba soroltam:

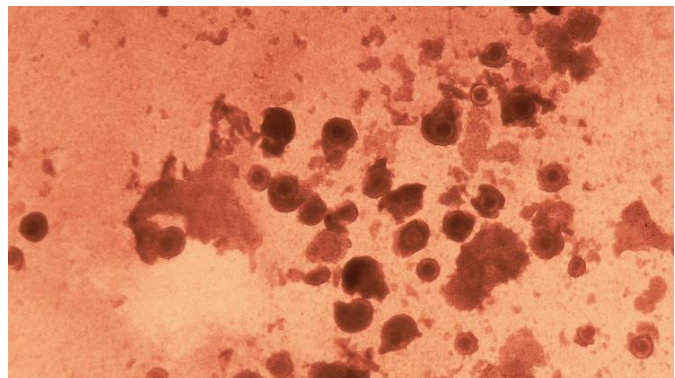
- 1- nincs kumulusz réteg
- 2- vékony, sérült kumulusz réteg
- 3- közepes vastagságú, ép kumulusz réteg
- 4- vastag, sértetlen kumulusz réteg

1, 2: csupasz vagy hiányos gomolyfelhős sejtrétegekkel rendelkező petesejtek.

3,4: két vagy több komplett, kompakt kumuluszréteggel és egyenletesen granulált citoplazmával rendelkező COC-k.

3.4.1. *In vitro* érlelés (IVM)

A jó minőségű (3,4 csoport) petesejteket 36°C-os BO-WASH médiumban átmostam (9. kép). Az 500 µl érlelő táptalajt tartalmazó BO-IVM médiumot négylyukú Petri-csészéket legalább 2 órán át előinkubáltam (ESCO CEICulture CO₂ inkubátor) mielőtt az oocitákat behelyeztem a vájatokba (5.5-6.5% CO₂, 21% O₂, 38.8 °C). A



9. kép: Petesejtek a BO-WASH médiumban. Készítette: Debnár V. J., Herceghalom (2023)

COC-kat (max. 50 petesejtek/lyuk) ezután egy négylyukú edénybe helyeztem 21-24 órás maturáció céljából. Az érést követően a petesejteket ismét értékeltem sztereo (Olympus SZ-7) mikroszkóp alatt. Az érett petesejteket szelektáltam termékenyítésre, teljes kumulusz, minden réteget érintő expanzió alapján. Az első kísérletben 47 darab, a második kísérlet során pedig 66 darab petesejtet használtam fel.

3.4.2. *In vitro* termékenyítés (IVF)

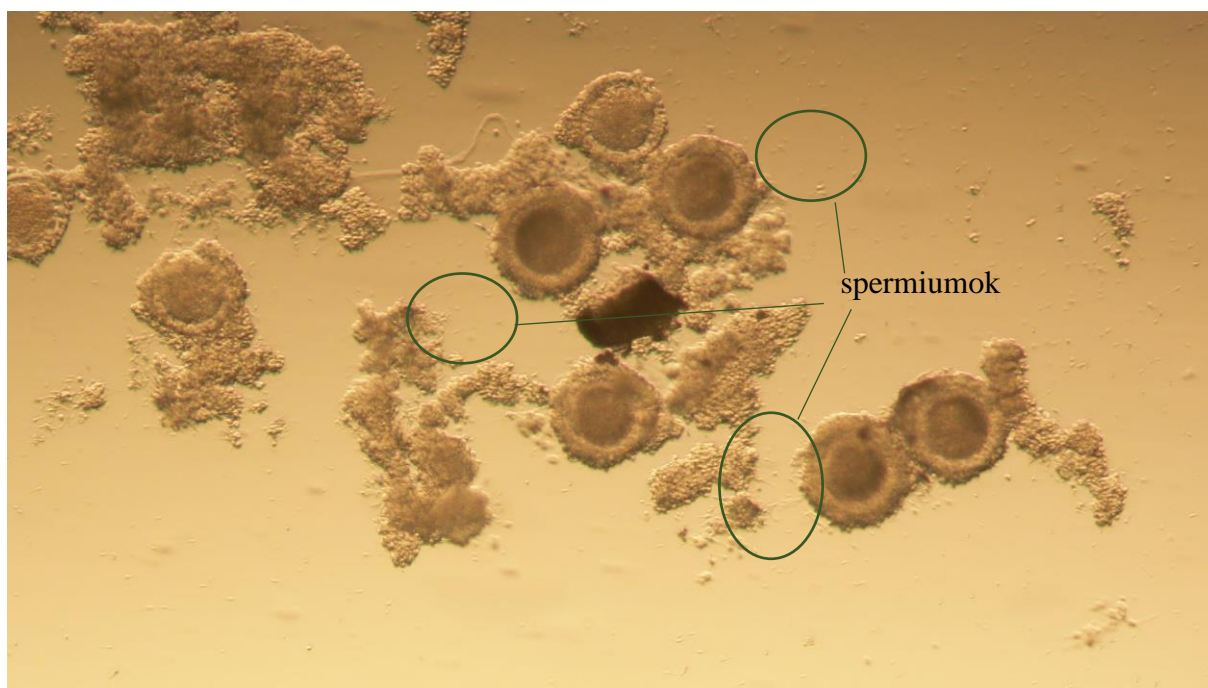
Az érett petesejteknek 400 µl-es cseppeket készítettem BO-IVF médiumból, amit min. 2 órán át ekvilibráltattam (5.5-6.5% CO₂, 21% O₂, 38.8 °C). Az IVF során a petesejteket 2 külön csoportra bontottam, a Nunc® edény felső két része lett a petesejtek átmosására szolgáló csepp, az alsó kettő pedig az ejakulált és a mellékhere eredetű spermiumokkal való termékenyítéshez kialakított vájat.

A termékenyítéshez racka kos ejakulált és racka mellékheréből kinyert spermiumot használtam.

A protokolltól eltérve, itt a spermamosás helyett az előző részben leírt eljárásnak megfelelő általunk legjobbnak ítélt IVFTALP SU módszerrel próbáltam a legmozgékonyabb

spermiumokat kiválogatni, a minél sikeresebb termékenyítéshez mind ejakulált, mind mellékhere eredetű spermiumok tekintetében.

A termékenyítési dózis a protokollban leírtak szerint történt, kiszámoltam Makler- sejtszámláló segítségével a koncentrációt, majd a termékenyítési dózishoz (2 M/mL) megfelelő mennyiséget adtam a különböző mintákból az érett petesejtekhez (10. kép). A tenyésztőedényt visszahelyeztem a az inkubátorba (5.5-6.5% CO₂, 21% O₂, 38.8 °C) 16-20 órára.

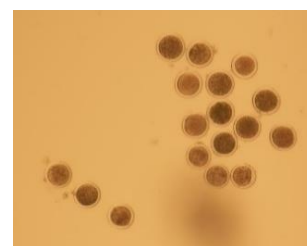


10. kép: Petesejtek és spermiumok az IVF pillanatában. Készítette: Debnár V.J., Herceghalom (2023)

3.4.3. *In vitro* tenyésztés (IVC)

Az *in vitro* tenyésztés első lépésében egy tenyésztőedényt készítettem, ahol 100 µl BO-IVC médiumot fedtem BO-OIL réteggel amit minimum 2 óra inkubálási idő (6% O₂, 5.5-6.5% CO₂, 87.5-88.5% N₂, 38.8°C) után lehet felhasználni. Minden tenyésztőcsepphez készítettem egy BO-IVC öblítőedényt is, hogy minél kevesebb toxikus anyag kerüljön át a cseppek változtatásakor.

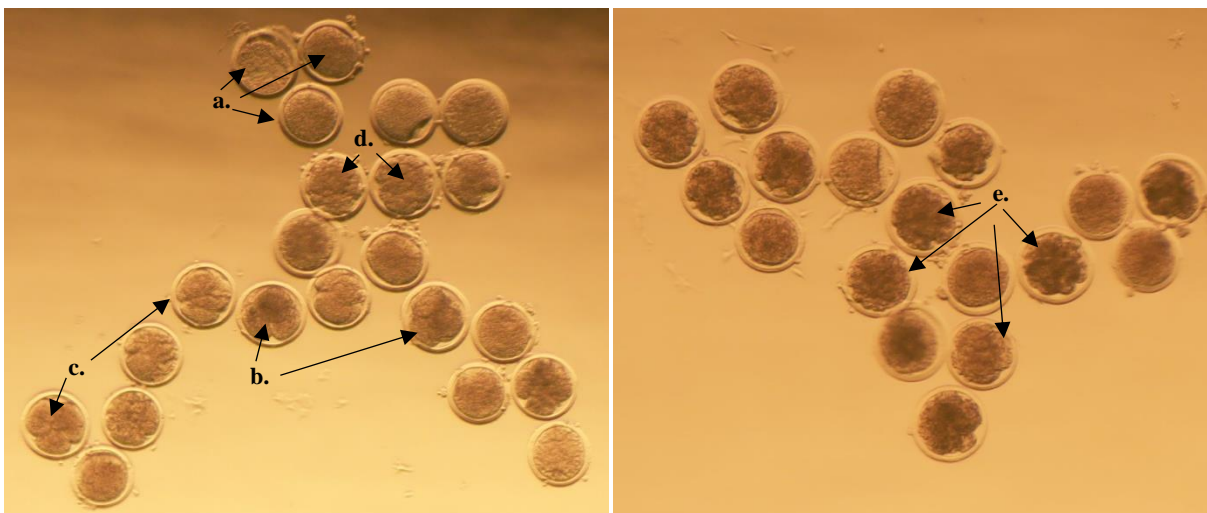
A zigótákat az IVF edényből 16-20 óra eltelté után első lépésben a BO-WASH médiumba helyeztem denudálás céljára (11. kép). Ehhez egy megfelelő üvegapillárst húztam, amivel a kumulust teljesen el tudom távolítani róluk. A mosó médiumban a zigóták maximum 30 percet lehetnek, a közeg hosszútávon toxikus számukra.



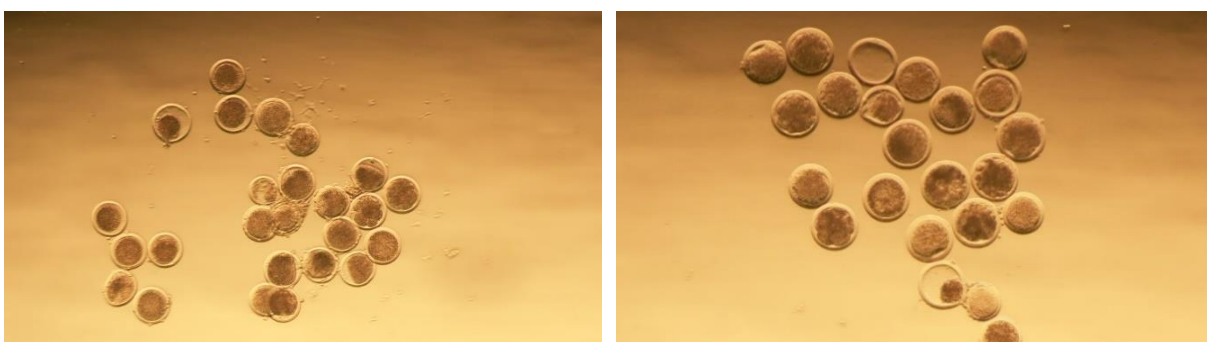
11. kép: Kumulusz eltávolítása. Készítette: Debnár V. J., Herceghalom (2023)

A kumulusz eltávolítása után a BO-IVC edény öblítő cseppjébe, majd a végleges BO-IVC cseppbe helyeztem a feltételezett zigótákat és bekerültek az inkubátorba (6% O₂, 5.5-6.5% CO₂, 87.5-88.5% N₂, 38.8°C).

Az IVC során naponta rögzítettem a fejlődést, a 4. illetve az 5. napon 8 sejtes és a morulává érett sejteket 2 féle módszerrel mélyhűtöttük (12., 13. kép).



12. kép: Különböző fejlődési stádiumban lévő embriók, ejakulált spermiummal történő termékenyítés után. Készítette: Debnár V. J., Herceghalom (2023). a.: Petesejt ami nem fejlődött tovább. b.: 4 sejtes állapot. c.: 6-8 sejtes állapot. d.: 8-16 sejtes állapot. e.: morulák



13. kép: IVF során mellékhere eredetű spermiummal termékenyült zigóták az IVC médiumban különböző fejlődési stádiumban. Készítette: Debnár V.J., Herceghalom (2023)

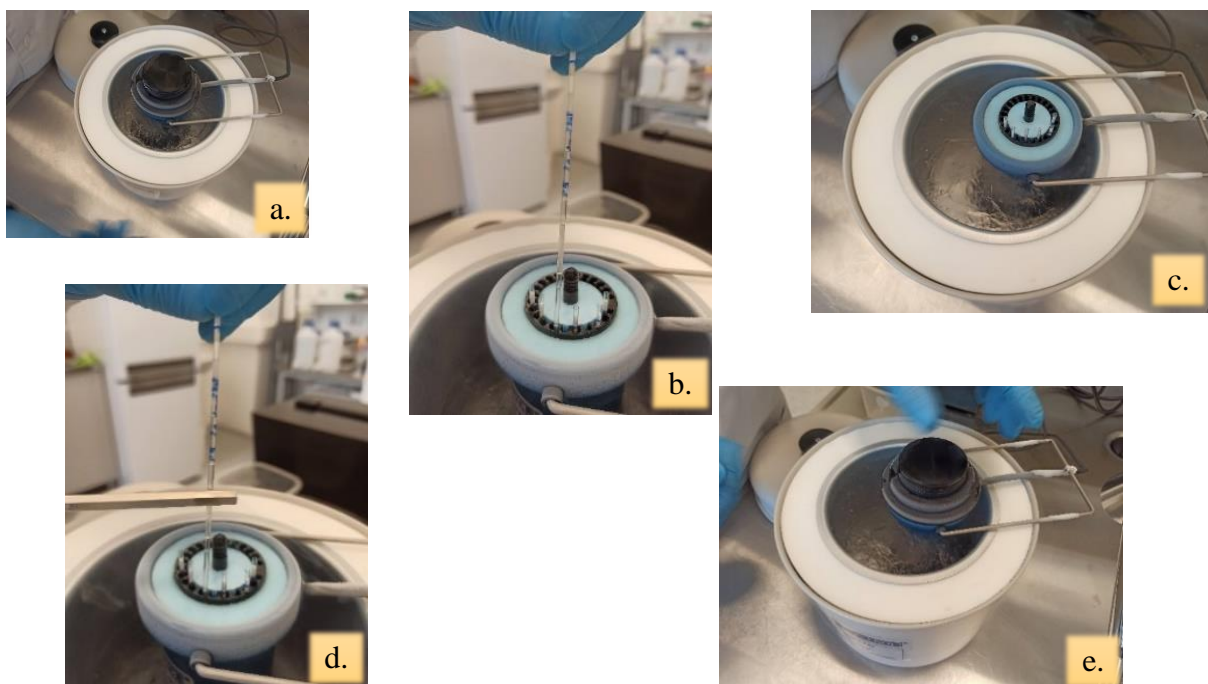
3.5. EMBRIÓK HOSSZÚ TÁVÚ ELTÁROLÁSÁNAK MÓDSZEREI

A morulák mélyhűtéséhez 2 féle eljárást alkalmaztunk. Az első egy etilén-glikolos fagyasztás volt, ahol a két ismétlésben végzett juh petesejtek *in vitro* előállításánál során mind mellékherei, mind ejakulált spermával történő termékenyítés során kapott morulák felét mélyhűtöttem.

A másik módszer a Kitazato , Cryotop® vitrifikáció volt, amivel a morulák másik felét mélyhűtöttük.

3.5.1. Krioprezelválás, etilén-glikolos fagyasztás

Az etilén- glikolos mélyhűtéshez egy speciálisan erre kialakított CryoLogic CL5500 szabályozott sebességű, biológiai minták mélyhűtésre kialakított eszközt használtunk. Ez az eszköz automatikusan biztosítja a megfelelő hőmérsékletet, programozhatóságának köszönhetően speciálisan külön-külön állatfajra be lehet állítani. Egy hőmérséklet szabályozóból, egy kriokamrából és egy kriofürdőből áll. A kamra közvetlenül a folyékony nitrogénben van és csatlakozik a hőmérsékletszabályozó vezérlőhöz. A mélyhűtés menetét a 14. kép szerint végeztük.

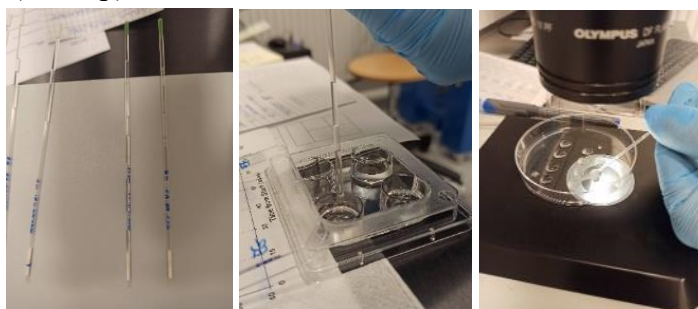


14. kép: A lassú mélyhűtés menete: a.: Az eszközt folyékony nitrogénnel töltöttük fel. b.: Behelyeztük az embriókkal töltött műszalmákat. c.: Műszalmák a mélyhűtő berendezésben. d.: Seeding. e.: Minták fokozatos hűtése -196 °C-ra.

A mélyhűtésre alkalmasnak bírált morulákat kiválogattuk és az alábbiak szerint 250 µl- es műszalmákba töltöttük.

Az eljárást az alábbiak szerint végeztük (15. kép):

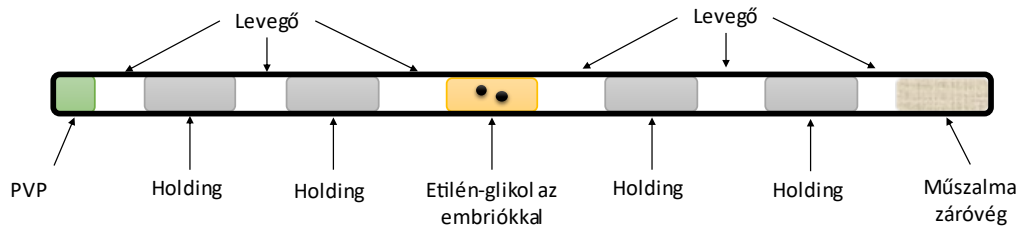
- Az embriókat 37°C-os holding médiumban 4x alaposan átmostuk (BoviHold, Minitübe, Ref. 19982/6047)
- Áthelyeztük őket 4 percre a 37°C-os etilén glikol



15. kép: Feliratozott műszalmák, a krioprotektáns médiumok és az embriók betöltése. Készítette: Debnár V.J., Herceghalom (2023)

médiumba (BoviFreeze, Minitübe, Ref.:19982/6052)

Végül műszalmába töltöttük, a végét PVP-vel (poly-vinyl- pyrrolidon) zártuk a 2.ábra szerint.



2. ábra: A műszalmába töltött embriók sematikus rajza. Készítette: Debnár V.J. (2023)

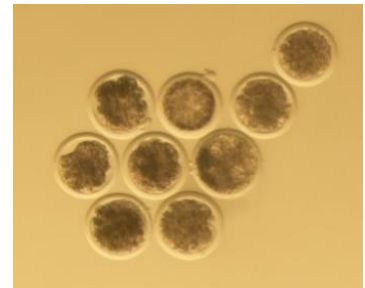
3.5.2. Vitrifikáció, Cryotop® módszerrel

A vitrifikációs eljárás során a Kitazato Vitrification Cryotop módszert használtuk (16. kép). Első lépésben kiválogattuk az általunk mélyhűteni kívánt morulákat. Elkészítettük a vitrifikációhoz szükséges tenyésztőedényeket. A protokollt követve az alábbi lépéseket végeztük:

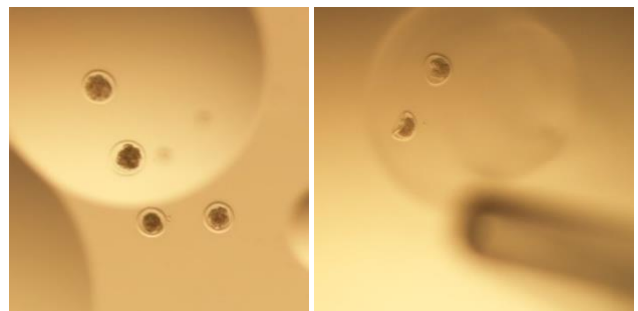


16. kép: Cryotop módszerhez szükséges eszközök. Készítette: Debnár V.J., Herceghalom (2023)

1. A vitrifikációs ES, VS1, VS2 médiumokból 300 µl mennyiséget szobahőmérsékleten a tenyésztő edénybe pipettáztuk.
2. Pasteur pipetta segítségével felszívtuk az embriókat és az ES tápközegbe helyeztük 10-15 percre. Ekkor az embrió zsugorodni kezdett, majd fokozatosan visszanyerte eredeti állapotát, ami azt jelenti, hogy az egyensúly befejeződött (17. kép).
3. Ekkor az embriókat felszívtuk minél kevesebb ES médiummal és átpipettáztuk a VS1 médiumba, ahol 3x alaposan átmostuk. Az embriók ebben a tápközegben maximálisan 30 másodpercet tölthetnek.
4. Ezután ismét felszívásra kerültek az embriók és áthelyeztük őket a VS2



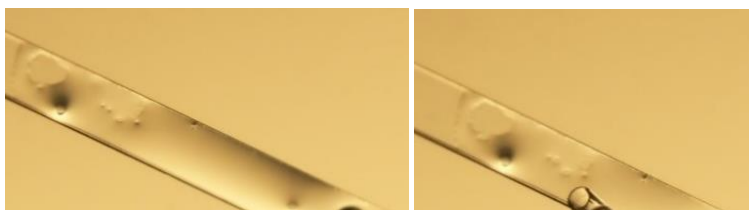
17. kép: Embriók az ES tápközegben. Készítette: Debnár V.J., Herceghalom (2023)



18. kép: VS2 médiumban történő átmosás. Készítette: Debnár V.J., Herceghalom (2023)

médiumba, ahol 2x-i alapos átmosás után kiszáradás okozta zsugorodás következik be (18.kép).

5. Ekkor a Cryotop szalmát a mikroszkóp alá helyeztük, az összezsugorodott embriókat pipetta segítségével a Cryotop felszínére helyeztük minimális térfogatú VS2 médiummal



19. kép: Embrió a Cryotop szalmán, majd a VS2 médium leszívása a felületről. Készítette: Debnár V.J., Herceghalom (2023)

(kevesebb, mint 0,1 μ l). Miután az embriókat elhelyeztük a maradék folyadékot leszívással eltávolítottuk. Egy Cryotopra két darab embriót helyeztünk (19.kép).

6. Végül a Cryotopot egy hirtelen mozdulattal a folyékony nitrogénbe merítettük, visszahelyeztük a szalma zárókupakját és konténerben eltároltuk (20. kép).



20. kép: Folyékony nitrogénben való eltárolás. Készítette: Debnár V.J., Herceghalom (2023)

3.6. AZ ADATOK KIÉRTÉKELÉSÉNEK MÓDJA

Az adatok összesítéséhez és grafikai ábrázolásához Microsoft Office 16 Excel táblázatkezelő programot használtunk.

GraphPad InStat Version 3.05 statisztikai programot használtunk az átlagok kiszámításához és az adatok értékeléséhez (Anova, Dunnett próba).

IBM SPSS 20 statisztikai programmal végeztük az eredmények összehasonlítását (páros T-próba).

4. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK

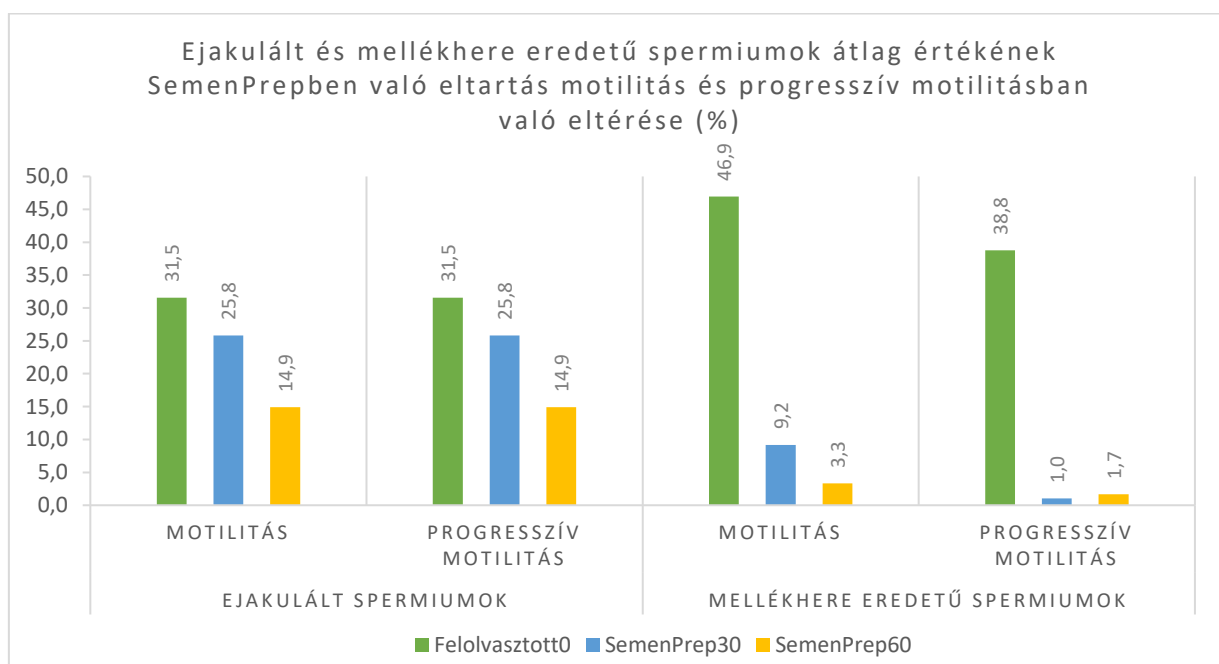
4.1. SPERMAMOSÁSI EREDMÉNYEK

Első kísérletemben a következőre kerestem a választ:

1. Az IVF-BIOSCIENCE által javasolt SemenPrep spermamosó médium 30 és 60 perces hatását vizsgáltam meg ejakulált és mellékhere eredetű mintákon. Kíváncsiak voltunk, hogy az idő eltelte mennyiben befolyásolja a spermiumok életképességét.

A kísérleteket 3 ismétlésben végeztem ejakulált és mellékhere eredetű spermiumok esetén is.

3. ábra: SemenPrepben való 30 és 60 perces eltartás



Amint a 3. ábrán is látszik, a spermamosási eljárás az ejakulált és a mellékhere eredetű spermiumok esetén a spermamosó médiumban az idő elteltével motilitási százalékban és progresszív motilitási százalékban csökkenést mutatott. A mellékhere eredetű spermiumok drasztikus motilitás és progresszív motilitásbeli csökkenése miatt a továbbiakban nem ismételtük a kísérleteket, további statisztikai elemzéseket nem végeztünk (3. ábra).

4.2. SWIM-UP HOZ HASZNÁLT TÁPTALAJOK ÖSSZEHASONLÍTÁSA

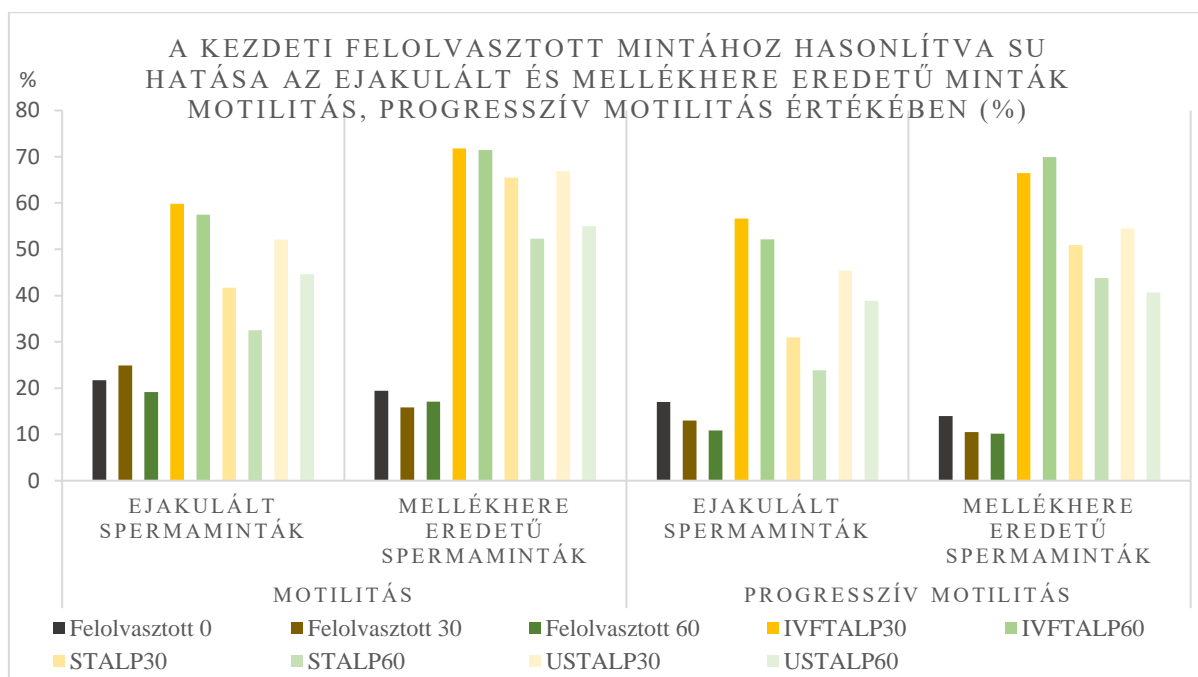
A spermamosás után létrehozott termékenyítőanyag csökkent motilitása miatt megoldást kellett találnunk arra, hogy a mélyhűtött- felolvasztott spermiumok közül egy jó motilitási értékekkel rendelkező szubpopulációt hozzunk létre, ezért a SU spermiumszelektációs módszert szerettünk volna kidolgozni juh IVF számára. A kísérlet során kíváncsiak voltunk a különböző táptalajok hatásaira a mélyhűtött, majd felolvasztott mintákra. Az értékelések

során kontrollként a felolvasztott, 1:9 arányban hígított mintát használtunk, illetve külön-külön vizsgáltuk az ejakulált és a mellékhere eredetű mélyhűtött- felolvasztott spermiumokat 5 ismétlésben.

1. Milyen hatással van motilitás, progresszív motilitás és egyéb kinetikai paraméterekre a különböző tápközegek használata?

1/a: A minták vizsgálata során megállapítható, hogy a felolvasztott mintához képest a SU motilitás és progresszív motilitásban jobb értékekkel rendelkező szubpopulációt alakított ki (4. ábra). Statisztikailag igazolt összefüggéseket a mellékhere eredetű spermiumoknál találtunk, ejakulált spermiumoknál is hatékonyan működik a SU, de a különböző táptalajokat összehasonlítva, a javító hatás a mintákban nem mutatott szignifikáns eltérést.

4. ábra: Az ejakulált és mellékhere eredetű spermaminták értékei láthatók a felolvasztott minta és a különböző SU médiumok javító motilitás és progresszív motilitási értékeivel (%).



A 4. ábrán látható, hogy mind ejakulált, mind mellékhere eredetű spermiumoknál a mindhárom SU kezelés jobb minőségű spermiumokat szelektált ki. Motilitás, progresszív motilitás szempontjából, azonban a kevés esetszám és a nagy szórás miatt statisztikai eltérést nem találtunk ($p > 0,05$).

1/b: Az 5. ábrán szereplő adatok alapján megállapítható, hogy a felolvasztott nem kezelt spermaminták és a különböző SU kezelésen átment csoportok között a mellékhere eredetű

spermamintáknál szignifikáns eltérés látható még a nagy szórás (kevés mintaszám) ellenére is.

5. ábra: Mellékhere eredetű spermiumok szignifikáns eltérése a felolvasztott mintához képest

| | MHF0 | MHIVFTALP 30 | MHIVFTALP 60 | MHSTALP 30 | MHSTALP 60 | MHUSTALP 30 | MHUSTALP 60 |
|-----------|-----------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|-----------------|
| MOT P | 19,4 ±1,1 | 71,8 ±16,2 ** | 71,4 ±8,9 ** | 65,5 ±6,2 ** | 52,2 ±20,6 ** | 66,8 ±11,2 ** | 55,0 ±6,1 ** |
| PMOT P | 13,9 ±2,8 | 66,4 ±19,6 ** | 69,9 ±11,4 ** | 50,9 ±5,7 * | 43,7 ±17,4 | 54,4 ±13,3 ** | 40,6 ±20,03 |
| DAP P | 35,5 ±2,1 | 49,9 ±1,8 ** | 52,7 ±3,2 ** | 45,8 ±3,9 * | 42,1 ±5,4 | 44,5 ±1,8 * | 39,9 ±3,4 |
| DSL P | 19,8 ±3,5 | 44,0 ±1,9 ** | 46,1 ±3,0 ** | 38,2 ±2,5 ** | 35,9 ±4,6 ** | 38,1 ±2,1 ** | 33,5 ±2,8 ** |
| VAP P | 78,9 ±6,4 | 111,5 ±5,4 ** | 114,2 ±5,8 ** | 101,3 ±6,9 ** | 97,1 ±11,9 | 100,3 ±3,7 * | 89,6 ±11,2 |
| VSL P | 44,1 ±8,2 | 98,7 ±6,6 ** | 100,1 ±6,7 ** | 84,7 ±7,5 ** | 83,1 ±10,4 ** | 86,3 ±4,8 ** | 75,1 ±7,7 ** |
| LIN P | 0,2 ±0,02 | 0,4 ±0,03 ** | 0,4 ±0,01 ** | 0,3 ±0,08 * | 0,4 ±0,02 * | 0,4 ±0,05 ** | 0,4 ±0,08 * |
| STR P | 0,5 ±0,06 | 0,8 ±0,03 ** | 0,8 ±0,03 ** | 0,8 ±0,05 ** | 0,8 ±0,01 ** | 0,8 ±0,02 ** | 0,8 ±0,07 ** |
| BCF P | 24,9 ±2,3 | 40,2 ±1,2 ** | 37,9 ±1,7 ** | 32,7 ±3,5 ** | 35,9 ±3,2 ** | 36,7 ±2,9 ** | 33,5 ±1,1 ** |

A csillag jelölések az MHF0-tól való eltérésszignifikanciaszintjét mutatják: * ($p < 0.05$), ** ($p < 0.01$), *** ($p < 0.001$)

1/c: Az ejakulált és mellékhere eredetű spermiumokon különböző ideig történt SU kezelés összehasonlítása során az alábbi paramétereket vizsgáltuk a spermiumok mozgáskarakterisztikájának szempontjából: motilitás, progresszív motilitás, BCF, WOB, LIN, STR.

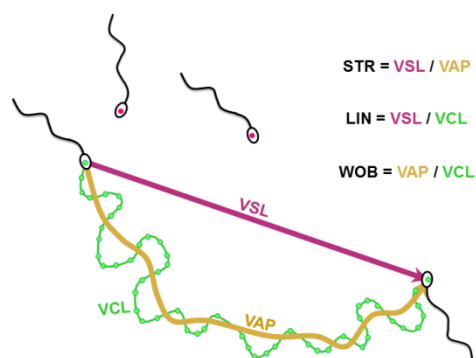
Motilitás és progresszív motilitási értékeknél nem találtunk szignifikáns eltérést ($p > 0,05$), egyéb kinetikai paraméterek vizsgálatánál a BCF értéknél jelentős szignifikáns eltérést találtunk SPTALP esetén (6. ábra).

6. ábra: A három médiumban történt SU kezelés hatása a kinetikai paraméterekre. A szignifikáns eltérés egymáshoz viszonyítva

| | | Szignifikáns eltérés BCF esetén | Szignifikáns eltérés WOB esetén | Szignifikáns eltérés LIN esetén | Szignifikáns eltérés STR esetén |
|-------------------|-----------------|---------------------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|
| EIVFTALP30 | MHIVFTALP 30 | ns. | *** | * | ns. |
| EIVFTALP60 | MHIVFTALP 60 | * | *** | *** | * |
| EUSTALP30 | MHUSTALP 30 | * | * | ** | ** |
| EUSTALP60 | MHUSTALP 60 | ns. | ** | ** | * |
| ESTALP30 | MHSTALP 30 | *** | *** | *** | *** |
| ESTALP60 | MHSTALP 60 | * | ** | ** | ** |

A csillag jelölések az egymástól való eltérés mértékét mutatják: * ($p < 0.05$), ** ($p < 0.01$), *** ($p < 0.001$). ns.: ($p > 0,05$).

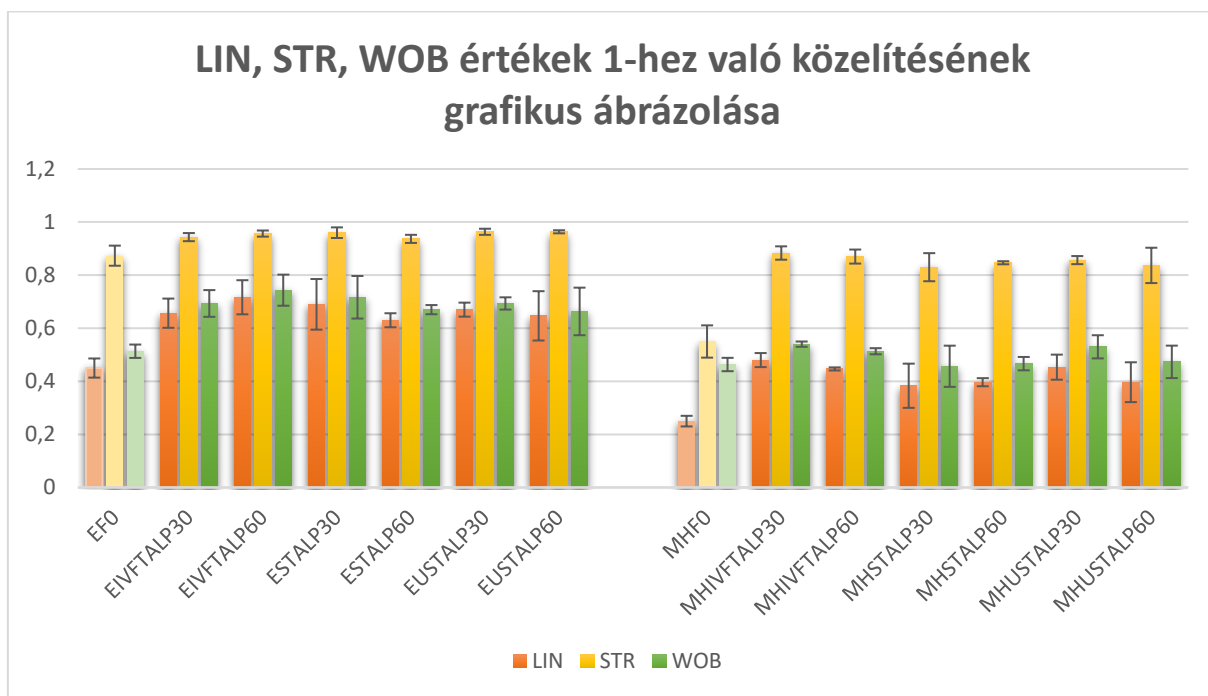
WOB, LIN és STR esetén minden ejakulált és mellékhere eredetű mintánál szignifikáns eltérést tapasztaltunk (6. ábra). Ez a három érték jelöli a sejtek egyenes vonalú, alacsony fejkilengéssel, alacsony hiperaktivitással és alacsony oldalirányú elmozdulással rendelkező sejtek arányát (21. kép).



21. kép: Spermiumok különböző mozgáskarakterisztikája

1/d: A 6. ábra alapján tovább vizsgáltuk a mintákat, megnéztük melyik esetben, mellékhere eredetű, vagy ejakulált spermiumoknál közelítenek az értékek WOB, LIN és STR esetén a 1-hez.

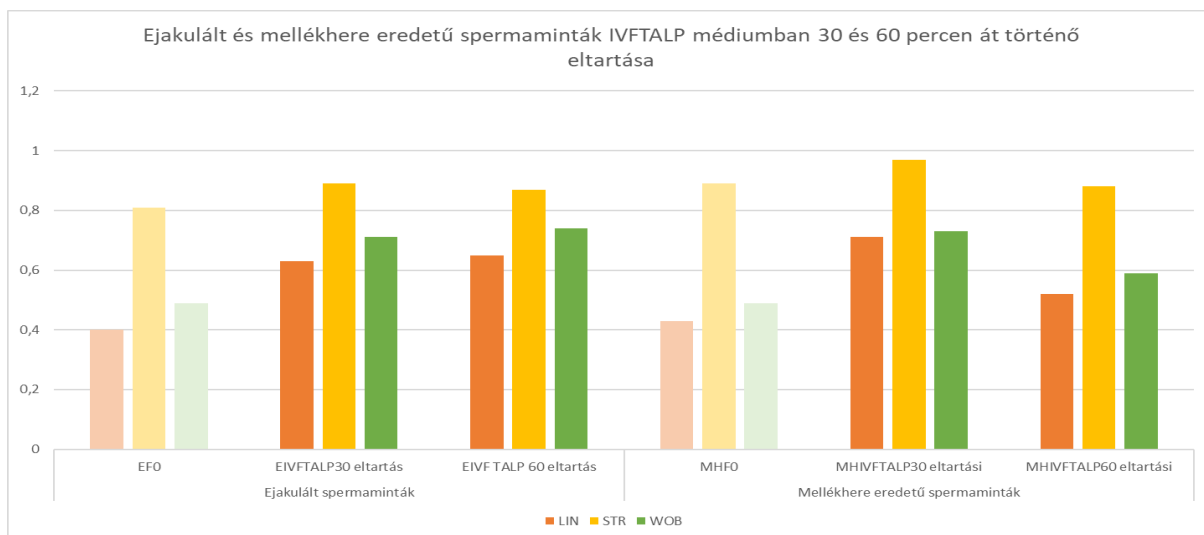
7. ábra.: Kinetikai paraméterek vizsgálata



A 7. ábra alapján látható, hogy a felolvasztott mintához képest az ejakulált spermiumok jobban közelednek az 1.-hez, ami azt mutatja, hogy mozgásukban kevesebb a fej kilengésére utaló mozgás, több az előre haladó mozgást végző sejt. A mellékhere eredetű mintákban a felolvasztott mintához képest mindhárom esetben jobb értékeket mutatnak, azonban az alacsony WOB és LIN értékek nagyobb oldalirányú mozgásra, engednek következtetni.

1/e: A vizsgálat során kíváncsiak voltunk, hogy az észlelt eltérések a SU hatásának, vagy csak az alkalmazott tápközegnek tudhatjuk-e be, ezért IVFTALP-ban eltartási tesztet végeztünk 38,5 °C-on, 5% CO₂ gázelegyenben.

8. ábra: IVFTALP médiumban történő eltartás hatása a különböző mozgási értékekre.



Az eredmények alapján megállapítható, hogy az IVFTALP-ban történő eltartás során nem változtak jelentősen ezek az értékek, ezért feltételezhető, hogy a SU során azok a sejtek úsznak fel, amelyek előrehaladó, egyenes vonalú mozgást végeznek (8. ábra).

1/f: Az idő függvényében a mellékhere eredetű spermamintákat minden típusú mozgáskarakterisztikát jellemző CASA értékre vizsgáltuk (9. ábra), azonban statisztikailag igazolható szignifikáns eltéréseket csak a mellékhere eredetű spermium minták esetében kaptunk.

9. ábra: Felolvasztott és SU minták összehasonlítása az idő függvényében

| | 30 PERC SU | | | | 60 perc SU | | | |
|--------|-------------|------------------|------------------|------------------|-------------|-------------------|------------------|------------------|
| | MHF30 | MHIVF30 | MHST30 | MHUST30 | MHF60 | MHIVF60 | MHST60 | MHUST60 |
| MOT P | 15,9 ±1,6 | 71,8 ±16,2 ** | 65,5 ±6,2 ** | 66,9 ±11,2 ** | 17,1 ±5,6 | 71,5 ±8,9 ** | 52,3 ±20,6 ** | 55 ±6,1 ** |
| PMOT P | 10,5 ±3,5 | 66,5 ±19,7 ** | 50,9 ±5,8 ** | 54,5 ±13,4 ** | 10,2 ±3,2 | 70 ±11,5 ** | 43,8 ±17,4 * | 40,7 ±20,1 |
| DCL P | 77,3 ±5,6 | 91,5 ±3,7 | 101,3 ±24,8 | 83,46 ±4,6 | 65,7 ±13,4 | 102,2 ±5,5 ** | 89,7 ±9,9 | 83,4 ±10,2 |
| DAP P | 33,4 ±3,2 | 49,9 ±1,9 ** | 45,8 ±3,9 ** | 44,6 ±1,9 ** | 28,2 ±4,3 | 52,8 ±3,3 ** | 42,1 ±5,5 ** | 39,9 ±3,4 ** |
| DSL P | 22,9 ±1,7 | 44, ±1,9 ** | 38,2 ±2,6 ** | 38,1 ±2,2 ** | 19,3 ±0,9 | 46,1 ±3 ** | 35,9 ±4,6 ** | 33,5 ±2,8 ** |
| VCL P | 161,6 ±12,9 | 204,3 ±8,4 | 222,9 ±42,5 * | 189,1 ±9,7 | 137,8 ±27,6 | 221,2 ±12,4 ** | 206,6 ±20,8 | 188,4 ±31,9 * |
| VAP P | 69,6 ±7,0 | 111,5 ±5,4 ** | 101,3 ±6,9 ** | 100,3 ±3,7 ** | 59,0 ±8,7 | 114,2 ±5,8 ** | 97,1 ±11,9 ** | 89,6 ±11,2 ** |
| VSL P | 47,8 ±3,5 | 98,7 ±6,6 ** | 84,7 ±7,5 ** | 86,3 ±4,80 ** | 40,4 ±2,0 | 100,1 ±6,7 ** | 83,1 ±10,4 ** | 75,1 ±7,7 ** |
| LIN P | 0,3 ±0,03 | 0,4 ±0,03 ** | 0,3 ±0,08 | 0,4 ±0,05 ** | 0,3 ±0,1 | 0,4 ±0,01 ** | 0,4 ±0,02 | 0,4 ±0,08 |
| STR P | 0,7 ±0,06 | 0,9 ±0,03 ** | 0,8 ±0,05 * | 0,9 ±0,02 * | 0,7 ±0,2 | 0,9 ±0,03 * | 0,8 ±0,01 * | 0,8 ±0,07 * |
| WOB P | 0,4 ±0,03 | 0,5 ±0,01 * | 0,4 ±0,08 | 0,5 ±0,04 * | 0,4 ±0,03 | 0,5 ±0,01 | 0,5 ±0,03 | 0,5 ±0,06 |
| BCF P | 24,5 ±2,47 | 40,2 ±1,27 ** | 32,7 ±3,53 ** | 36,7 ±2,90 ** | 25,0 ±0,6 | 37,9 ±1,7 ** | 35,9 ±3,2 ** | 33,5 ±1,1 ** |

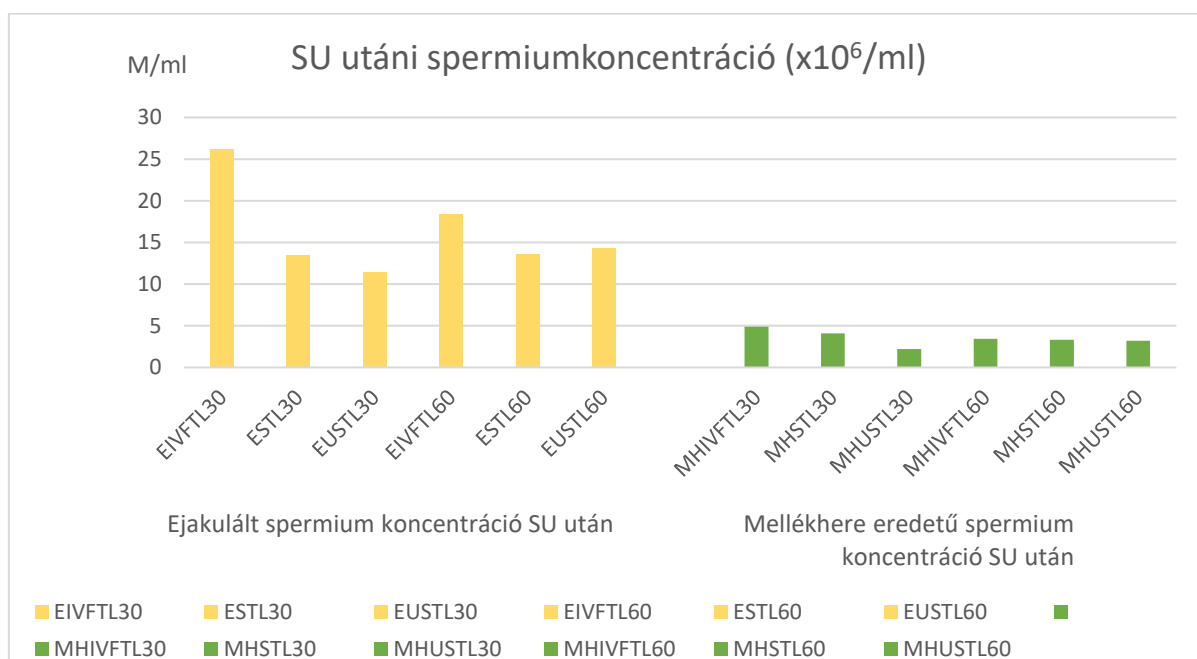
A csillag jelölések az egymástól való eltérés mértékét mutatják: * ($p < 0.05$), ** ($p < 0.01$), *** ($p < 0.001$). ns.: ($p > 0,05$)

4.3. KONCENTRÁCIÓVÁLTOZÁS A SWIM-UP SORÁN

A koncentráció meghatározásánál a SU során a spermiumok visszanyerésének mennyiségét szeretnénk volna meghatározni. A felúsztatásos módszerrel nagy spermiumveszteség rovására tudunk csak jó motilitású közeget kapni. A második kísérletben megnéztük a 30, vagy a 60 perces SU esetén kapunk nagyobb koncentrációjú szuszpenziót (10.ábra).

1. Az egyes tápközegek segítségével milyen koncentrációban tudjuk visszanyerni az élő, jól mozgó spermiumokat?

10. ábra: Ejakulált, mellékherei spermiumok koncentrációjának különbsége.

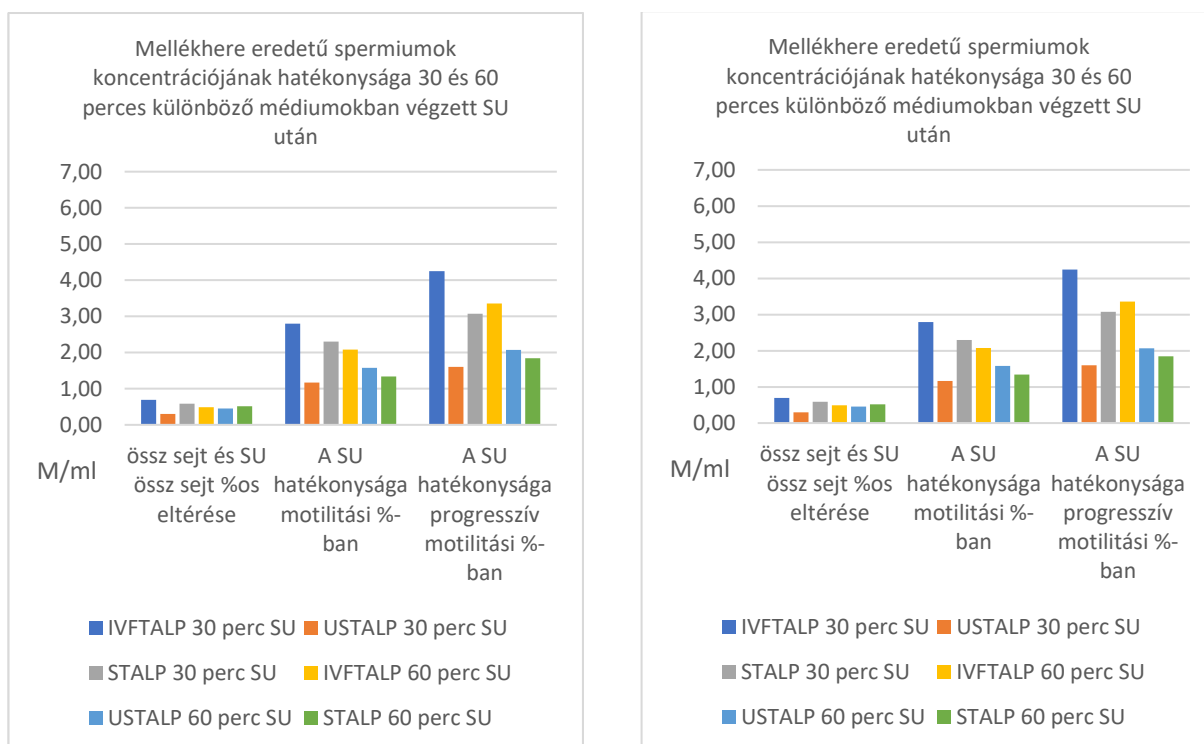


Ejakulált és mellékhere eredetű mélyhűtött felolvasztott szalmák ANOVA Tukey próbával végzett statisztikai elemzése kimutatta, hogy az IVFTALP30 kezelés során felúszott spermiumok mennyisége szignifikánsan eltért a többi kezeléshez képest: EIVFTALP30 és ESTALP30, EUSTALP30 ($p < 0,05$). EIVFTALP30 és MHSTALP30, MHUSTALP30 esetén pedig $p < 0,001$.

Továbbá három különböző médium koncentrációjának különbségét hasonlítottuk össze ANOVA Tukey statisztikai értékeléssel: EIVFTALP30 vs ESTALP30 ($P < 0,05$), EIVFTALP30 vs EUSTALP30 ($P < 0,05$), közepes szignifikáns eltérést és EIVFTALP30 vs MHIVFTALP30 ($P < 0,001$), EIVFTALP30 vs MHSTALP30 ($P < 0,001$), EIVFTALP30 vs MHUSTALP30 ($P < 0,001$) erős szignifikáns eltérést találtunk.

2. A szakirodalomban legtöbbször leírt 60 perces SU idejének lerövidítése mennyiben változtatja meg a minta koncentrációját, van-e különbség a 30 és 60 perces SU során a médiumok közötti koncentrációjában?

11. ábra: Ejakulált és mellékhere eredetű spermiumok koncentrációjának hatékonysága a 30 és 60 perces SU kezelések során



A grafikonon látható, hogy a 30 perces SU kezelés hatására a sejtek az IVFTALP médiumban magasabb koncentrációban voltak megtalálhatók, mint a többi kezelési csoportban. Az ejakulált minták esetében kiugró értéket tapasztaltunk 30 perc után (11. ábra).

SPSS páros T-próbával elvégzett statisztikai elemzés során az EIVFTALP30 perc – MHIVFTALP 30 perc között, és az EUSTALP30 perc – MHUSTALP 30 perc között találtunk szignifikáns eltérést (12. ábra).

12. ábra: Spss páros T-próbával végzett minták szignifikáns eltéréseinek eredményei.

| | | Paired Differences | | | | t | df | Sig. (2-tailed) | |
|---|--------------------------|--------------------|----------------|-----------------|---|-----------|-------|-----------------|-------|
| | | Mean | Std. Deviation | Std. Error Mean | 95% Confidence Interval of the Difference | | | | |
| | | | | | Lower | | | | Upper |
| 1 | EFO - MHF0 | 170,70000 | 190,72831 | 110,11704 | -303,09540 | 644,49540 | 1,550 | 2 | ,261 |
| 2 | EIVFTALP30-MHIVFTALP30 | 21,32000 | 6,49668 | 3,75086 | 5,18136 | 37,45864 | 5,684 | 2 | ,030 |
| 3 | ESTALP30 - MHSTALP30 | 9,43333 | 9,42461 | 5,44130 | -13,97869 | 32,84536 | 1,734 | 2 | ,225 |
| 4 | EUSTALP30 - MHUSTALP30 | 9,21333 | 3,71168 | 2,14294 | -,00698 | 18,43365 | 4,299 | 2 | ,050 |
| 5 | EIVFTALP60 - MHIVFTALP60 | 14,97000 | 9,99839 | 5,77258 | -9,86739 | 39,80739 | 2,593 | 2 | ,122 |
| 6 | ESTALP60 - MHSTALP60 | 10,22333 | 8,77374 | 5,06552 | -11,57185 | 32,01851 | 2,018 | 2 | ,181 |
| 7 | EUSTALP60 - MHUSTALP60 | 11,10000 | 8,21522 | 4,74306 | -9,30775 | 31,50775 | 2,340 | 2 | ,144 |

4.4. IN VITRO EMBRIÓELŐÁLLÍTÁS ÉS MÉLYHŰTÉS

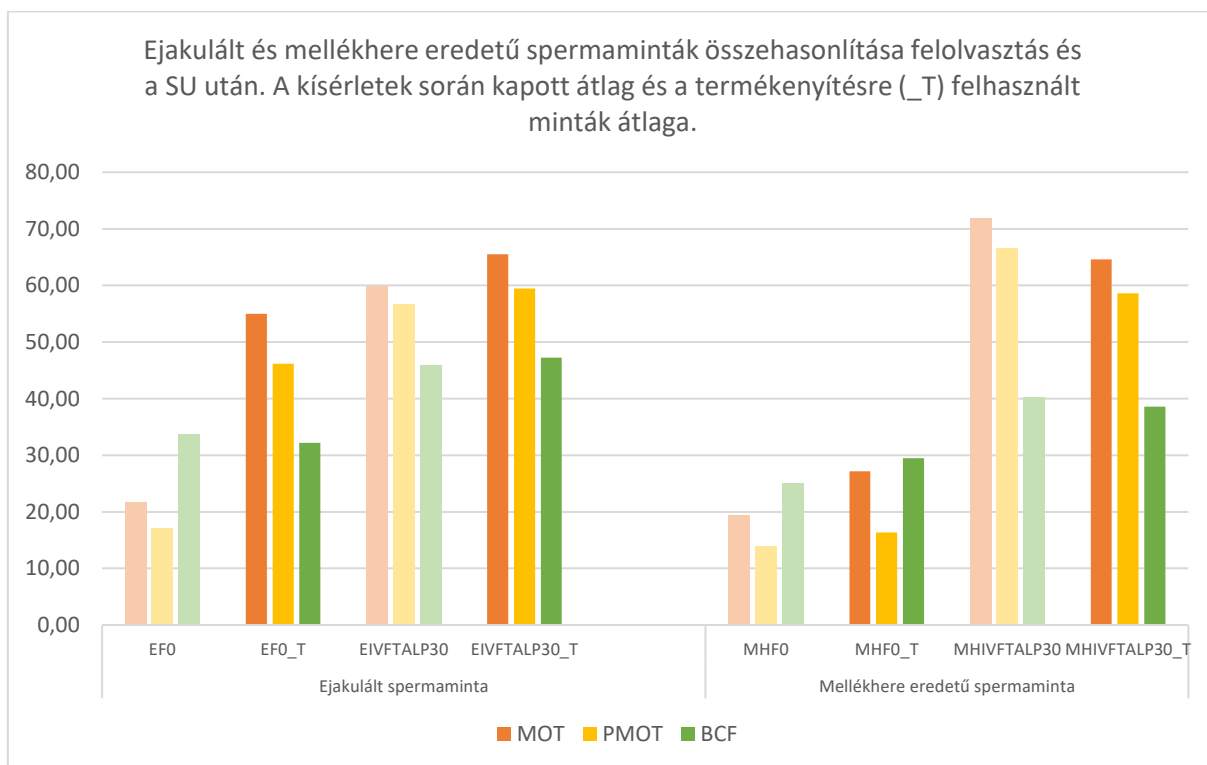
In vitro embrióelőállítási kísérletemet két ismétlésben végeztem. A vágóhídról az első ismétlés során 6 racka anya teljes nemi traktusából 12 darab petefészek, a második ismétlés során 8 racka anyától 14 petefészek bizonyult alkalmasnak a további munkához. A petefészkekből összesen 113 darab petesejtet tudtam kinyerni a két ismétlés során, ezeket IVM tápközegben érleltem 21-24 órán át.

Az *in vitro* embrióelőállítási lépéseket, a termékenyítés kivételével az IVF-BIOSCIENCE által megadott protokoll szerint végeztem.

1. A termékenyítést mindkét ismétlésben 2 fajta spermát, ejakulált racka kos mélyhűtött-felolvasztott és mellékhere eredetű racka kostól származó mélyhűtött- felolvasztott szalmákat használtam. CASA vizsgálatot végeztem előtte, majd a SU után is, illetve meghatároztam a koncentrációt. Ezeket az adatokat összehasonlítottam a SU kísérletek során kapott eredményekkel:

1/a.: A kezdeti, és a SU során használt kísérletekhez és termékenyítéshez használt minták motilitási, progresszív motilitási és BCF értékei:

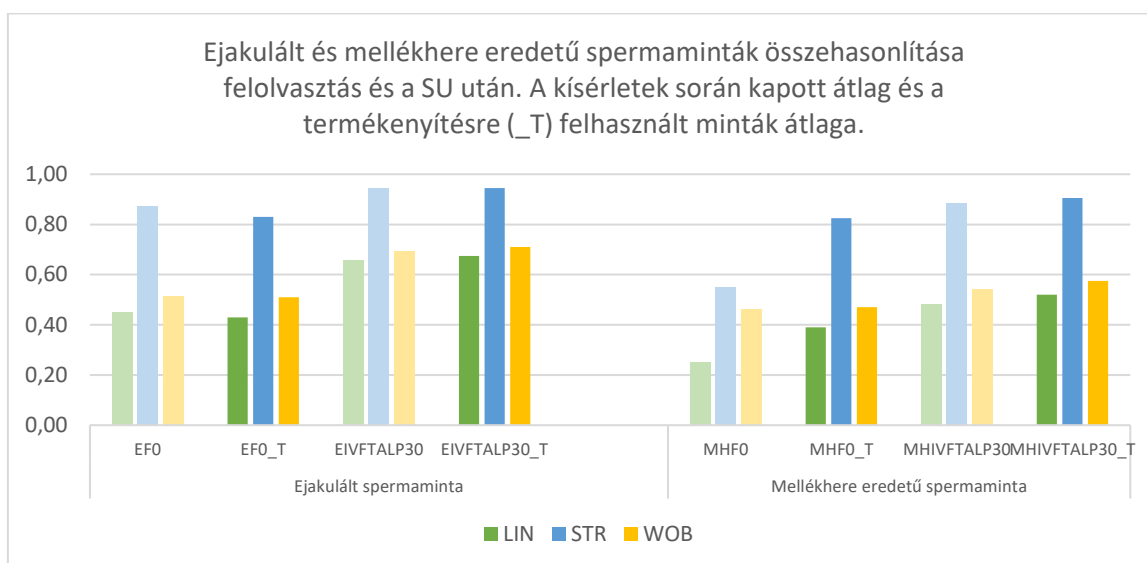
13. ábra: Termékenyítőkéesség szempontjából jelentős adatok, a motilitás, progresszív motilitás és BCF érték.



Termékenyítőkéesség szempontjából fontos értékek: a motilitás, progresszív motilitás és a BCF értékek, ezeket a garfikonon ábrázolva látható, hogy a SU után a kísérletek- és a két termékenyítés során sem ejakulált, sem a mellékhere eredetű spermamintákban nagy eltérés nem látható (13. ábra).

1/b.: A spermiumok mozgásának értékeléséhez a LIN, STR és WOB értékek vizsgálatára van szükség, hiszen ezek mutatják meg, hogy a spermium mennyire mutat egyenes, előrehaladó mozgást. Ebben az esetben összehasonlítottam a kísérleteket során felolvasztott minták átlagát és a termékenyítéshez használt minták átlagát.

14. ábra: Ejakulált és mellékhere eredetű spermaminták LIN, STR és WOB átlag értékei.



A grafikonon látható a felolvasztott és SU kezeléssel átesett párok között nem látható nagymértékű eltérés. Azonban a SU hatására azok a sejtek úsztak fel a felülúszóba, akik egyenes vonalú mozgást végeztek (14. ábra).

1/c.: Összehasonlítottam a 30 perces IVFTALP médiummal végzett termékenyítési- és a kísérletek során kapott sejtek számát. (15. ábra). Mindkét spermiumminta esetén a kísérletek során a SU hatékonyabbnak bizonyult, mint amikor a termékenyítés során használtuk. A felúszott sejtek arányában enyhe csökkenést, azonban a motilis és progresszív motilis sejtek arányában jóval erősebb csökkenés látható.

15. ábra: IVFTALP médiummal végzett termékenyítési- és a kísérletek során kapott sejtek száma

| | | A felúszott összes sejtek aránya | A felúszott motilis sejtek % aránya az eredeti minta motilis sejtekhez képest. | A felúszott progresszív motilis sejtek % aránya az eredeti minta progresszív motilis sejtekhez képest. |
|--|---|----------------------------------|--|--|
| Ejakulált spermaminták | Kísérletek során kapott átlag eredmények | 1,67 | 5,41 | 6,58 |
| | Termékenyítés során kapott átlag eredmények | 1,87 | 2,24 | 2,41 |
| Mellékhere eredetű spermaminták | Kísérletek során kapott átlag eredmények | 0,69 | 2,79 | 4,25 |
| | Termékenyítés során kapott átlag eredmények | 0,63 | 1,52 | 2,23 |

2. A termékenyítés során az érett petesejteket két csoportra bontottam, az egyik csoportba összesen 47 db petesejt került, amit fekete racka kos ejakulált-, a másik csoportban összesen 66 db érett petesejt került, ezeket mellékhere eredetű mélyhűtött-felolvasztott mintájával termékenyítettem. A termékenyítést a kísérletek során tapasztalt magasabb koncentrációjú 30 perces SU eljárást használtam, IVFTALP médiummal.

Az IVC edénybe helyezést követő 4. és 5. napon összesen 18 db ejakulált, és 9 db mellékhere eredetű spermával való termékenyítésből származó morula stádiumban lévő embriót találtunk.

Az embriók mélyhűtését két módszer alapján végeztük az alábbi elosztásban:

| | EG programozott mélyhűtés | Kitazato Cryotop® vitrifikáció |
|--|--------------------------------------|---|
| Ejakulált spermiumokkal termékenyített morula darabszám | 8 darab – 4 darab műszalma | 10 darab – 5 darab cryotop szalma |
| Mellékhere eredetű spermiumokkal termékenyített morula daraszám | 5 darab – 2 darab műszalma | 4 darab – 2 darab cryotop szalma |

A petesejtek IVEP eljárása során a juhok petefészkeiből átlagosan 4,3 darab morfológiai követelményeknek megfelelő petesejtet tudtam kinyerni, ezekből pedig összesen 27 darab fejlődött morula stádiumba, ami azt jelenti, hogy 1 darab petefészekből, 1,038 darab petesejt tudott továbbfejlődni.

A termékenyítéshez használt ejakulált spermiumok a petesejtek 38,3 %-át, a mellékhere eredetű spermiumok pedig a 13,63 %-át tudta termékenyíteni és jutott el morula állapotig.

5. KÖVETKEZTETÉSEK ÉS JAVASLATOK

Kísérleteim alapján megállapítható, hogy a swim up használatával a gyengébb minőségű mélyhűtött termékenyítőanyag javítható, mind ejakulált, mind mellékhere eredetű spermiumok esetén.

A SemenPrepben történő kezelés erősen csökkentette a spermiumok motilis és progresszív motilis százalékát ejakulált és mellékhere eredetű spermiumoknál is, ezért ezt a kezelést *in vitro* termékenyítések előtti spermakezelések során nem tartjuk hatékony eljárásnak. A mosófolyadékban történő kezelés csupán a mélyhűtéshez használt különféle hígítók kimosására alkalmas.

A különböző médiumok, IVFTALP, STALP, USTALP mindegyike sikeresen alkalmazható a SU során, statisztikailag igazolható hatást a mellékhere eredetű spermiumoknál lehetett kimutatni, azonban az ejakulált spermiumok esetén mintánként értékelve látszik a minőségbeli javulás, mind a motilitás, progresszív motilitás esetén is a felülúszóból izolálható spermium frakció tekintetében.

A spermiumok mozgáskarakterisztikájára vonatkozó értékekben mint a WOB, LIN és STR az ejakulált és mellékhere eredetű spermiumok különböző SU médiumokkal kezelt mintáit egymással összehasonlítva minden esetben szignifikáns eltérést találtunk ($p < 0,05$, $p < 0,01$, $p < 0,001$).

A minták további vizsgálata során megállapítható, hogy a felolvasztott mintához képest az ejakulált és a mellékhere eredetű spermiumok a SU után jobb értékeket mutattak, mint a felolvasztott, nem kezelt minták WOB, LIN és STR értékei, ami a sejtek egyenes vonalú, előrehaladó mozgásáról adnak előrejelzést. Az IVFTALP-ban való 30 és 60 perces eltartás azonban nem javított ezeken az értékeken, ezért valószínűsíthető, hogy nem a médium hatására változtak ezek az értékek. Feltételezhető, hogy azok a sejtek képesek a SU során a felülúszóba felúszni, akik egyenes vonalú, egyenes mozgásra képesek, ezért a SU tekinthető szelektálásnak is. Ezek a mozgáskarakterisztikák szükségesek a későbbiekben a sikeres termékenyítéshez.

A többi mozgásra vonatkozó értékek statisztikai vizsgálata során csak a mellékhere eredetű spermiumok esetén találtunk szignifikáns eltéréseket.

A SU során az idő lerövidítésével végzett vizsgálat során, ahol a két különböző időpontot hasonlítottuk össze a sejtek mennyiségével, a 30 perces SU-al nagyobb spermiumszámot

tudtunk elérni, ejakulált és mellékhere eredetű spermiumoknál is, így ennek a használatát javaslom a továbbiakban az IVF során.

Az *in vitro* embrióelőállítás során összehasonlítottuk a két különböző módon nyert spermaminta termékenyítőképességét. A SU során mindkét esetben az általunk legjobbnak ítélt IVFTALP médiumot használtuk. Azért hogy minél nagyobb koncentrációjú spermium szuszpenziót juttassuk az érett petesejtekhez, a 30 perces felúsztatást választottuk.

A termékenyítéshez és a kísérletek során használt ejakulált és mellékhere eredetű spermamintákat a termékenyítőképesség előrejelzéséhez szükséges motilitás, progresszív motilitás, WOB, LIN, STR és BCF értékek összehasonlítása során nem találtunk eltérést. Azonban a SU során felúszott sejtek enyhe-, a motilis és progresszív sejtek pedig jelentős csökkenést mutattak a termékenyítéshez használt mintákban. A termékenyítés 2 ismétlésben, racka kos mellékhere eredetű spermával történt, ellentétben a kísérletek során használt merino, cikta, cigája és racka spermiummal. Ez akár összefüggésben lehet a szezonnal, a fajtával, vagy a spermium feldolgozásának módjával. Ezért érdemes lenne a kísérletet más fajtával, szezonban és szezonon kívül nyert gamétákkal megismételni. Azonban elképzelhető, hogy a mellékhere eredetű spermiumok érési folyamatához a felolvasztás után szeminális plazma hozzákeverésével javítható lehet az *in vitro* termékenyítés, a spermiumok érési folyamatait ezzel be tudnák fejezni (Domínguez, et al., 2008; Andrade, et al., 2022).

Az IVF során az osztódásnál is eltérést tapasztaltam a termékenyítés hatékonyságában, ezért feltételezzük, hogy a WOB, LIN, STR és BCF értékek prediktív módon utalhatnak a termékenyítő anyag *in vitro* fertilitására.

Sikeresen mélyhűtöttünk 18 darab ejakulált és 9 darab mellékhere eredetű spermiummal termékenyített racka juh embriót, ahol kétféle mélyhűtési protokollt, a Kitazato Cryotop és az EG programozott mélyhűtést használtuk, majd az embriókat folyékony nitrogénben eltároltuk.

Hazánkban először történt meg *post mortem* kinyert gamétákból keletkezett embriók mélyhűtése juh fajban.

A jövőben ezeket az embriókat szeretnénk felolvasztani és recipiens anyákba ültetni, hogy a gyakorlatban igazoljuk a *post mortem* gamétákkal történő *in vitro* embrió előállítás *ex situ in vitro* génmegőrzésre való alkalmasságát.

6. ÖSSZEFOGLALÁS

Kutatásaim során olyan kísérleteket végeztem el, amelyek elengedhetetlenek ahhoz, hogy a későbbiekben *post mortem* eljárással kinyert gamétákat sikeresen alkalmazzunk *ex situ* génmegőrzés hatékonyságának javítására.

Kísérleteim során elsőként a spermiumok szelektációs módszerének beállításával kezdtünk. A műhüvellyel kinyert ejakulált spermaminták 2014. és 2017. között lettek mélyhűtve, amelyik minta felolvasztás után nem érte a 40%-os motilitási értéket, selejtezésre kerültek. A leselejtezett mintákkal kezdtem a SU beállítását, ahol 3 különböző médiumot, az IVFTALP, STALP és USTALP-ot használtam. A tápközegek használatánál fontos paraméterek voltak: a motilitási, progresszív motilitási és a különböző termékenyítésre utaló értékek, a WOB, LIN, STR és BCF érték. Ezeket az értékeket CASA vizsgálattal határoztam meg közvetlen felolvasztás előtt, majd a különböző időkben végzett SU után. Párhuzamosan eltartást végeztem a felolvasztott mintákkal és a SU idejének lejártával azokat is CASA-val értékeltem.

Miután sikeresen eredményeket értem el ejakulált spermamintákkal, mellékhere eredetű spermiumokkal is elvégeztem a SU eljárást a három különböző médiummal. Ahhoz, hogy mellékhere eredetű spermiumokkal tudjak dolgozni, vágóhídról beérkezett mellékheréből kinyertük a spermiumot, amit aztán mélyhűtöttünk. A felolvasztás után a mintákat az ejakulált spermiumokkal megegyező módon vizsgáltam.

Eredményeink alapján kijelenthetjük, hogy a SU során az IVFTALP minden esetben megnövelte a motilitás, progresszív motilitás és egyéb mozgás karakterét jellemző paraméterek, mint a BCF, LIN, WOB és STR értékeit. Ezek a értékek a termékenyítőképességre utaló adatok, a spermium mozgáskarakteristikájáról adnak információt és elengedhetetlen a sikeres termékenyítéshez. Vizsgálatokat végeztem, hogy ezeket a javító hatású értékeket a spermiumban a SU, vagy maga a médium okozza, ezért 30 és 60 perces IVFTALP eltartást végeztem. Az eredmények alapján megállapítottuk, hogy a SU-nak van javító hatása, azok a sejtek képesek átjutni a felülúszóba, amelyek megfelelnek az egyenes vonalú előrehaladó mozgásnak. A SU során az idő lerövidítésével végzett vizsgálat során a 30 perces SU-al nagyobb spermiumszámot tudtunk elérni, ejakulált és mellékhere eredetű spermiumoknál is.

További vizsgálatokat végeztem a spermaminták felolvasztás utáni kezelésére, ahol az IVF-BIOCSIENCE által forgalmazott SemenPrep spermamosó médiumot használtam, azonban a sejtek motilitási, progresszív motilitási százaléka alulmúlta az eredeti minta értékeit.

A petesejtek IVEP eljárása során megállapítható, hogy a juhok petefészkeiből átlagosan 4,3 darab morfológiai követelményeknek megfelelő petesejtet tudtam kinyerni, ezekből pedig összesen 27 darab fejlődött morula stádiumba, ami azt jelenti, hogy 1 darab petefészekből, 1,038 darab petesejt tudott továbbfejlődni.

A termékenyítéshez használt ejakulált spermiumok a petesejtek 38,3 %-át, a mellékhere eredetű spermiumok pedig a 13,63 %-át tudta termékenyíteni és jutott el morula állapotig.

A 18 darab ejakulált spermiummal termékenyített és a 9 darab mellékhere eredetű spermiummal termékenyített embriókat kétféle mélyhűtési eljárással sikeresen eltároltuk.

Az elvégzett kísérletek sorozata egy előtanulmány volt, további ismétlésekre lesz szükség a módszerek fejlesztése érdekében, de az IVFTALP-al való SU az IVF előtt mindenképpen sikeresnek mondható, a továbbiakban ajánljuk ennek a használatát.

7. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönettel tartozom *Dr. Bodó Szilárd*nak, témavezetőmnek, aki a kísérletek során mindenben a segítségemre volt, a sok új ötletet és javaslatot, az együtt gondolkodás lehetőségét, a kísérletek tervezését és az ehhez szükséges feltételek biztosítását.

Köszönettel tartozom *Mujitaba Malam Abulbashar*nak és *Tokár Alexandrának* akik biztosítani tudták, hogy a vágóhídról a laboratóriumba kerüljenek a nemi szervek.

Külön szeretném megköszönni *Dr. Kútvölgyi Gabriellának*, aki szakmai hozzáértésével, konzultációival segítette a munkámat.

Szeretném megköszönni *Radnainé Szentpáli Judit*nak a kísérletek elvégzésénél nyújtott folyamatos segítségét.

Köszönet *Szegedi Mónikának*, *Papp Zoltánnak* és *Gál Andrásnak* a vágóhídon precízen kivágott nemi szerveket.

Végül köszönettel tartozom *férjemnek*, aki megértően elfogadta a sok hajnali és éjszakai munkát.

8. IRODALOMJEGYZÉK

- Abdelhakeam, A., Graham, E. & Vazquez, I., 1991. Studies on the absence of glycerol in unfrozen and frozen ram semen: Fertility trials and the effect of dilution methods on freezing ram semen in the absence of glycerol. *Cryobiol.* 28, pp. 36-42.
- Ahmed, T. és mtsai., 2019. Cryopreservation of Ram Cauda Epididymal Spermatozoa Using Different Buffers and Sugar Combinations. *Journal of Animal Research*, 9. kötet, pp. 927-933.
- Andrabi, S. & Maxwell, W., 2007. A review I reproductive biotechnologies for conservation of endangered mammalian species. *Anim. Reprod. Sci.* 99, pp. 223-243.
- Andrade, A., Knox, R., Torres, M. & Pavaneli, A., 2022. What is the relevance of seminal plasma from a functional and preservation perspective?. *Anim. Reprod. Sci.*, 246. kötet.
- Anel, L. és mtsai., 2003. Field and in vitro assay of three methods for freezing ram semen. *Theriogenology* 60, pp. 1293-1308.
- Arav, A. és mtsai., 2002. New trends in gamete's cryopreservation. *Mol. Cel. Endocrinol.* 187, pp. 77-81.
- Arlotto, T., Schwartz, J., First, N. & Liebfried-Rutledge, M., 1996. Aspects of follicle and oocyte stage that affect in vitro maturation and development of bovine oocytes. *Theriogenology* 45, pp. 943-956.
- Armstrong, D., 2001. Effect of maternal age on oocyte developmental competence. *Theriogenology* 55, pp. 1303-1322.
- Armstrong, D., Kotaras, P. & Earl, C., 1997. Advances in production of embryos in vitro in juvenile and prepubertal oocytes from calf and lamb. *Reprod. Fertil. Dev.* 9, pp. 333-339.
- Barati, F., Mahabadi, M. & Mohammadi Gh.A., 2009. Cryopreservation of in situ cool stored buffalo (*Bubalus bubalis*) epididymal sperm. *Iranian Journal of Veterinary Research* 10, pp. 339-345.
- Barbas, J. & Mascarenhas, R., 2009. Cryopreservation of domestic animal sperm cell. *Cell Tissue Bank* 10, pp. 49-62.
- Baril, G. és mtsai., 2001. Successful direct transfer of vitrified sheep embryos. *Theriogenology*, 56. kötet, pp. 299-305.
- Baril, G. és mtsai., 2001. Successful direct transfer of vitrified sheep embryos. *Theriogenology*, 56. kötet, pp. 299-305.
- Barker, C., 1958. The collection of semen from bulls, rams and bucks by electro-ejaculator. *Can. J. Comp. Med.* 22, pp. 3-8.
- Berger, T., Mars, R. & Moyer, D., 1985. Comparison of techniques for selection of motile spermatozoa. *Fertil Steril*, pp. 268-73.
- Berlinguer, F. és mtsai., 2007. Cryopreservation of European mouflon (*Ovis gmelini musimon*) semen during the non-breeding season is enhanced by the use of Trehalose. *Reprod. Dom. Anim.* 42, pp. 202-207.

- Bertol, M. A., 2016. *Cryopreservation of Epididymal Sperm*. hely nélkül: ismeretlen szerző
- Bilodeau-Goeseels, S. & Panich, P., 2002. Effect of oocyte quality on development and transcriptional activity in early bovine embryos. *Anim. Reprod. Sci.* 71, pp. 143-155.
- Bodó, I., 1985. HUNGARIAN ACTIVITIES ON THE CONSERVATION OF DOMESTIC ANIMAL GENETIC RESOURCES. *Animal Genetic Resources*, pp. 19-25.
- Bodó, I., 2001. Régi magyar háziállatfajtáink.. *Magyar Tudomány*, p. 5.
- Bodó, I. & Veress, L., 1997. Cigájatenyésztés Jugoszláviában. *Magyar Állattenyésztől Lapja*, 3. kötet, p. 7.
- Bodó, S., 2003. *Az in vitro embrió-előállítás és embrióbiopszia alkalmazásának lehetősége a szarvasmarhatenyésztésben*. Debrecen, 120 p.: Doktori (PhD) értekezés.
- Brair, V. és mtsai., 2020. Gene expression patterns of in vivo-derived sheep blastocysts is more affected by vitrification than slow freezing technique. *Cryobiology*, 95. kötet, pp. 110-115.
- Byrne, G. és mtsai., 2000. Effects of freezing rate of ram spermatozoa on subsequent fertility in vivo and in vitro. *Anim. Reprod. Sci.* 62, pp. 265-275.
- Camargo, L. és mtsai., 2006. Factors influencing in vitro embryo production. *Anim. Reprod.* 3, pp. 19-28.
- Catt, S. és mtsai., 1996. Birth of male lamb derived from an in vitro matured oocytes fertilized by intracytoplasmic injection of a single presumptive male sperm. *Vet. Rec.* 139, pp. 494-495.
- Chen, L. és mtsai., 1990. Hyaluronic acid synthesis and gap junction endocytosis are necessary for normal expansion of the cumulus mass. *Mol. Reprod. Dev.* 26, pp. 236-247.
- Chen, X.-Y. és mtsai., 2008. Induction of lamb follicular development and embryo production in vitro. *Chinese J. Agric. Biotechnol.* 5, pp. 257-262.
- Cognie, Y., 1999. State of the art in sheep-goat embryo transfer. *Theriogenology* 51, pp. 109-116.
- Cox, J. & Alfaro, V., 2007. In vitro fertilization and development of OPU developed goat and sheep oocytes. *Reprod. Dom. Anim.* 42, pp. 83-87.
- Crozet, N., Ahmed-Ali, M. & Dubos, M., 1995. Developmental competence of goat oocytes from follicles of different size categories following maturation, fertilization and culture in vitro. *J. Reprod. Fertil.* 103, pp. 293-298.
- Cunningham, E., 1999. The application of biotechnologies to enhance animal production in different farming systems. *Livest. Prod. Sci.* 58, pp. 1-24.
- Cseh, S., El Abidine, M., Bilton, R. & Moore, N., 1984. Mélyhűtött juhembriók átültetése. *Magyar Állatorvosok Lapja*, 39. kötet, pp. 72-73.
- Cseh, S. & Dohy, J., 2003. ASSZISZTÁLT REPRODUKCIÓS TECHNIKÁK (ART) A HAZAI ÁLLATTENYÉSZTÉSI GYAKORLATBAN. *Állattenyésztés és Takarmányozás*, 52. kötet, pp. 3-15.

- Cseh, S. & Seregi, J., 2007. The practical experiences of the sheep embryo transfer. *Theriogenology*, p. 39.
- Cseh, S. és mtsai., 1995. In vitro fertilizációval előállított juh embriók sikeres átültetése. *Magyar Állatorvosok Lapja*, 50. kötet, pp. 829-831.
- De La Torre-Sanchez, J., Preis, K. & Seidel, G. J., 2006. Metabolic regulation of in vitro produced bovine embryos. I. Effects of metabolic regulators at different glucose concentrations with embryos produced by semen from different bulls. *Reprod.Fertil. Dev.* 18, pp. 585-596.
- de Oliveira Leme, L. és mtsai., 2016. Effect of vitrification using the Cryotop method on the gene expression profile of in vitro–produced bovine embryos. *Theriogenology*, 4. kötet, pp. 724-733.
- De, A. és mtsai., 2011 . In vitro development of goat (*Capra hircus*) embryos following cysteamine supplementation of the in vitro maturation and in vitro culture media. *Small ruminant research* , 96. kötet, pp. 185-190.
- Debnár, V., 2015. *Spermavétel és mélyhűtés módszerének kidolgozása üregi nyúl (*Oryctolagus cuniculus*) ex situ génbank számára*, Gödöllő: ismeretlen szerző
- Devendra, C., 1980. Potential of Sheep and Goats in Less Developed Countries. *Journal of Animal Science*, pp. Volume 51, Issue 2, August, Pages 461–473,.
- Dinnyés, A., Liu, J. & Nedamble, T., 2007. Novel gamete storage. *Reprod. Fertil. Dev.* 19, pp. 1-13.
- Domínguez, M. és mtsai., 2008. Seasonal variations in the composition of ram seminal plasma and its effect on frozen-thawed ram sperm. *Theriogenology*, 69. kötet, pp. 564-573.
- Donnay, I. és mtsai., 1998. Vitrification of in vitro produced bovine blastocysts: methodological studies and developmental capacity. *Anim Reprod Sci.*, 52. kötet, pp. 93-104.
- Dorado, J., Rodriques, I. & Hildalgo, M., 2007. Cryopreservation of goat spermatozoa: Comparison of two freezing extenders based on post thaw sperm quality and fertility rates after artificial insemination. *Theriogenology* 68, pp. 168-177.
- Duranthon, V. & Renard, J., 2001. The development competence of mammalian oocytes: a convenient but biologically fuzzy concept. *Theriogenology* 55, pp. 1277-1289.
- Egerszegi, I. és mtsai., 2011. *Reproductive Methods in Low Input Animal Breeding*. Hollandia, Ethical Consideration in Livestock Breeding.
- Egerszegi, I., Sarlós, P. & Rátky, J., 2012. Hortobágyi racka kosok mellékhere eredetű spermájának mélyhűtése- a génmegőrzés egy lehetséges módja. *Magyar Állatorvosok Lapja*, 134. kötet, pp. 524-528.
- Elder, K. & Dale, B., 2000. In vitro fertilization. *Cambridge University Press*.
- Fair, T., Hyttel, P. & Greve, T., 1995. Bovine oocyte diameter in relation to maturational competence and transcriptional activity. *Mol. Reprod. Dev.* 42, pp. 437-442.

- Falchi, L., Ledda, S. & Zedda, M., 2022. Embryo biotechnologies in sheep: Achievements and new improvements. *Reproduction in Domestic Animals*, 57. kötet, pp. 22-33.
- Fernandez-Santos, M. és mtsai., 2006. Influence of various permeating cryoprotectants on freezability of Iberian red deer (*Cervus elaphus hispanicus*) epididymal spermatozoa: effects of concentration and temperature of addition. *J. Androl.* 27, pp. 734-745.
- Fry, R. és mtsai., 2004. Pregnancies from frozen IVF cattle embryos using sex-sorted and unsorted sperm. *Reprod. Fertil. Dev.* 16, , p. 254 (Abstr.).
- Ganan, N., Gomendio, M. & Roldan, E., 2009. Effect of storage of domestic cat (*Felis catus*) epididymides at 5 °C on sperm quality and cryopreservation. *Theriogenology* 72, pp. 1268-1277.
- Gandolfi, F. & Moore, R., 1987. Stimulation of early embryonic development in the sheep by co-culture with oviduct epithelial cells. *J. Reprod. Fertil.* 81. kötet, pp. 23-28.
- Garde, J. és mtsai., 1998. Postmortem Assessment of Sperm Characteristics of the Red Deer During the Breeding Season. *Journal of Reproductive Systems*, 41. kötet, pp. 195-202.
- Gardner, D., Lane, M., Spitzer, A. & Batt, P., 1994. Enhanced rates of cleavage and development for sheep zygotes cultured to the blastocyst stage in vitro on the absence of serum and somatic cells: amino acids, vitamins and culturing embryos in groups stimulate development. *Biol. Reprod.*, 50. kötet, pp. 390-400.
- Gibbons, A., Cueto, M. & Bonnet, F., 2011. A simple vitrification technique for sheep and goat embryo cryopreservation. *Small Ruminant Research*, 95. kötet, pp. 61-64.
- Gilchrist, R. & Thompson, J., 2007. Oocyte maturation: Emerging concepts and technologies to improve developmental potential in vitro. *Theriogenology* 67, pp. 6-15.
- Gillan, L., Maxwell, W. & Evans, G., 2004. Preservation and evaluation of semen for artificial insemination. *Reprod. Fertil. Dev.* 16, pp. 447-454.
- Graham, J. & Moce, E., 2005. Fertility evaluation of frozen/thawed semen. *Theriogenology* 64, pp. 492-504.
- Guiliano, S. és mtsai., 2008. Collection method, season and individual variation on seminal characteristics in llama (*Lama glama*). *Anim. Reprod. Sci.* 104, pp. 359-369.
- Gupta, P. és mtsai., 2005. Stimulation of in vitro oocyte maturation with a novel peptide isolated from follicular fluid of the buffalo (*Bubalus bubalis*). *Small Rumin. Res.* 59, pp. 33-40.
- Hafez, B. & Hafez, E., 2000. Reproduction in farm animals. *Lippincott Williams & Wilkins*.
- Hafez, E., 1987. Reproduction in farm animals. 5th Edition. *Lea & Febiger, Philadelphia*.
- Han, C. és mtsai., 2016. Evaluation of the semen swim-up method for bovine sperm RNA extraction. *Genet. Mol. Res.*
- Hendriksen, P. és mtsai., 2000. Bovine follicular development and its effect on the in vitro competence of oocytes. *Theriogenology* 53, pp. 11-20.

- Hiemstra, S., van der Lende, T. & Woelders, H., 2005. The potential cryopreservation and reproductive technologies for animal genetic resources conservation strategies. The role of biotechnology. *Villa Gualio, Turin, Italy*, pp. 25-36.
- Hishinuma, M., Suzuki, K. & Sekine, J., 2003. Recovery and cryopreservation of sika deer (*Cervus nippon*) spermatozoa from epididymides stored at 4 degrees C. *Theriogenology* 59, pp. 813-820.
- Hollinshead, F. és mtsai., 2004. Birth of lambs of a pre-determined sex after in vitro production of embryos using frozen-thawed sex-sorted and re-frozen- thawed ram spermatozoa. *Reprod. 127*, pp. 557-568.
- Hollinshead, F., O'Brien, J., Maxwell, W. & Evans, G., 2002. Production of lambs of predetermined sex after the insemination of ewes with low numbers of frozen-thawed sorted X- or Y- chromosome bearing spermatozoa. *Reprod. Fertil. Dev. 11*, pp. 123-126.
- Horváth, A., Vásárhelyi, J. & Szenci, O., 2006b. A hímivarsejtek mozgása: Irodalmi összefoglaló: 2. rész. A mozgást vizsgáló módszerek fejlődése.. *Magyar Állatorvosok Lapja*, 128. kötet, pp. 437-442.
- Hussein, T., Thompson, J. & Gilchrist, R., 2006. Oocyte-secreted factors enhance oocyte developmental competence. *Dev. Biol.* 296, pp. 514-521.
- Hyttel, P., Fair, T., Callesen, H. & Greve, T., 1997. Oocyte growth, capacitation and final maturation in cattle. *Theriogenology* 47, pp. 23-32.
- IETS, 2022. *2021 Statistics of embryo production and transfer in domestic farm animals*, hely nélkül.: IETS.
- Isachenko, E., 2003. Vitrification of mammalian spermatozoa in the absence of cryoprotectants: from past practical difficulties to present success. *Reprod. Biomed. Online* 6, pp. 191-200.
- Izquierdo, D. és mtsai., 1998. Effect of sperm capacitation and fertilization media on IVF and early embryo development of prepubertal goat oocytes. *Theriogenology* 49, pp. 1501-1513.
- Johnson, L. és mtsai., 2000. Cryopreservation of flow cytometrically sorted boar sperm: effects on in vivo embryo development. *J. Anim. Sci. Suppl.* 78, p. 198 (Abstr.).
- Kaabi, M. és mtsai., 2003. Effect of epididymis handling conditions on the quality of ram spermatozoa recovered post-mortem. *Theriogenology*, pp. 1249-1259.
- Katska-Ksiazkiewicz, L., Opiela, J. & Rynska, B., 2007. Effects of oocytes quality, semen donor and embryo co-culture system on the efficiency of blastocyst production in goats. *Theriogenology* 68, pp. 736-744.
- Katska-Ksiazkiewicz, L., Rynska, B., Gajda, B. & Smorag, Z., 2004. Effect of donor stimulation, frozen semen and heparin treatment on the efficiency of in vitro embryo production in goats. *Theriogenology* 62, pp. 576-586.
- Keskintepe, L., Darwish, G., Kenimer, A. & Brackett, B., 1994. Term development of caprine embryos derived from immature oocytes in vitro. *Theriogenology* 42, pp. 527-535.

- Khatir, H., Lonergan, P., Carolan, C. & Mermillod, P., 1996. Prepubertal bovine oocyte: a negative model for studying oocyte developmental competence. *Mol. Reprod. Dev.* 45, pp. 231-239.
- Kidson, A., 2005. In vitro development in pig. *Veterinary Sciences Tomorrow*.
- Koeman, J., Keefer, C., Baldassarre, H. & Downey, B., 2003. Developmental competence of prepubertal and adult goat oocytes cultured in semi-defined media following laparoscopic recovery. *Theriogenology* 60, pp. 879-889.
- Kovács, A. & Foote, R., 1992. Viability and Acrosome Staining of Bull Boar and Rabbit spermatozoa. *Biotechnic Histochemistry*, 67. kötet, pp. 119-24.
- Krisher, R., 2004. The effect of oocyte quality on development. *J. Anim. Sci* 84, pp. 14-23.
- Kumar, S., Millar, J. & Watson, P., 2003. The effect of cooling rate on the survival of cryopreserved bull, ram, and boar spermatozoa: a comparison of two controlled-rate cooling machines. *Cryobiol.* 46, pp. 246-253.
- Kuwayama, M. & Kato, O., 2000. All-round vitrification method for human oocytes and embryos. *J. Assist. Reprod. Genet.*, 17. kötet, p. 477.
- Kuwayama, M., Vajta, G., Ieda, S. & Kato, O., 2005. Comparison of open and closed methods for vitrification of human embryos and the elimination of potential contamination. *Reprod Biomed Online*, 11. kötet, pp. 608-614.
- Lane, M.-E., Therioen, I., Moreau, R. & Manjunath, P., 1999. Heparin and high-density lipoprotein mediate bovine sperm capacitation by different mechanisms. *Biol. Reprod.* 60, pp. 169-175.
- Lechniak, D., Kaczmarek, D., Stanislawski, D. & Adamowicz, T., 2002. The ploidy of in vitro matured bovine oocytes is related to the diameter. *Theriogenology* 57, pp. 1303-1308.
- Lone, F., Islam, R., Khan, M. & Sofi, K., 2011. Effect of transportation temperature on the quality of cauda epididymal spermatozoa of ram. *Animal Reproduction Science*, 123. kötet, pp. 54-59.
- Lonergan, P. és mtsai., 2003. Oocyte and embryo quality: effect of origin, culture conditions and gene expression patterns. *Reprod. Dom. Anim.* 38, pp. 259-267.
- Mahammadpour, A., 2007. Comparative histomorphological study of ovary and ovarian follicles in Iranian Lori-Bakhtiari sheep and native goat. *Pak J Biol Sci*, pp. 673-675.
- Malcotti, V., Pelufo, V., Bergamo, N. & Aisen, E., 2012. Recovery of epididymal spermatozoa from bull and red deer, stored at different times and temperatures before freezing–thawing. *Anim. Prod. Sci.* 52, pp. 741-745.
- Marco-Jimenez, F., Vincente, J. & Viudes-de-Castro, M., 2008. Seminal plasma composition from ejaculates collected by artificial vagina and electro-ejaculation in Guirra ram. *Reprod. Dom. Anim.* 43, p. 403–408.
- Marco-Jimenez, F. és mtsai., 2005. Effect of semen collection method on pre-and post-thaw Guirra ram spermatozoa. *Theriogenology* 64, pp. 1756-1765.

- Martí, E., Pérez-Pé, R., Muiño-Blanco, T. & Cebrián-Pérez, J., 2013. Comparative Study of Four Different Sperm Washing Methods Using Apoptotic Markers in Ram Spermatozoa. *Journal of Andrology*, 27/6. kötet, pp. 746-753.
- Marti, J., Marti, E., Cebrian-Perez, J. & Muino-Blanco, T., 2003. Survival rate and enzyme activity of ram spermatozoa after dilution with different extenders or selection by a dextran swim-up procedure. *Theriogenology* 60, pp. 1025-1037.
- Martinez-Pastor, F. és mtsai., 2005. Decay of sperm obtained from epididymes of wild ruminants depending on postmortem time. *Theriogenology* 63, pp. 24-40.
- Martino, A., Songsasen, N. & Leibo, S., 1996. Development into blastocysts of bovine oocytes cryopreserved by ultra-rapid cooling. *Biol. Reprod.*, 54. kötet, pp. 1059-1069.
- Martino, A., Songsasen, N. & Leibo, S., 1999. Development into blastocysts of bovine oocytes cryopreserved by ultra-rapid cooling. *Biol. Reprod.*, 54. kötet, pp. 1059-1069.
- Martins, C. és mtsai., 2009. Recovery, cryopreservation and fertilization potential of bovine spermatozoa obtained from epididymides stored at 5 degrees C by different periods of time. *Anim. Reprod. Sci.* 116, pp. 50-57.
- Martins, C. és mtsai., 2009. Recovery, cryopreservation and fertilization potential of bovine spermatozoa obtained from epididymides stored at 5 °C by different periods of time. *Animal Reproduction Science*, 116. kötet, pp. 50-57.
- Matas, C. és mtsai., 2010. Sperm treatment affects capacitation parameters and penetration ability of ejaculated and epididymal boar spermatozoa. *Theriogenology* 74, pp. 1327-1340.
- Mattner, P. & Voglmayr, J., 1962. A comparison of ram semen collected by artificial vagina and by electro-ejaculation. *Aust. J. Exp. Agric. Anim. Husb.* 2, pp. 78-81.
- Maxwell, W. & Salamon, S., 1993. Liquid storage of ram semen. *Reprod. Fertil. Dev.* 5, pp. 613-638.
- Mazur, P., 1984. Freezing of living cells: mechanisms and implications. *Am. J. Physiol.* 247, pp. 125-142.
- Merlo, B., Iacono, E., Regazzini, M. & Zambelli, D., 2008. Cat blastocysts produced in vitro from oocytes vitrified using the cryoloop technique and cryopreserved electro-ejaculated semen. *Theriogenology* 70, pp. 126-130.
- Mir, S. és mtsai., 2012. Effect of cold storage period on the quality of ram cauda epididymal spermatozoa recovered post-mortem. *Turk. J. Vet. Anim. Sci.* 36, pp. 683-687.
- Miyamoto, H. & Ishibashi, T., 1977. Survival of frozen-thawed mouse and rat embryos in the presence of ethylene glycol. *J. Reprod. Fertil.*, 50. kötet, pp. 373-5.
- MJKSZ, 2023. *Magyar Juh- és Kecsketenyésztők Szövetsége*. [Online] Available at: <https://mjksz.hu/tenyesztes/fajtak/hortobagyi-racka-feher-fekete-juh> [Hozzáférés dátuma: 2023].
- Moce, E. & Graham, J., 2008. In vitro evaluation of sperm quality. *Anim. Reprod. Sci.* 105, pp. 104-118.

- Moore, K. & Bonilla, A., 2006. Cryopreservation of mammalian embryos: the state of art. *ARBS Ann. Rev. Biomed. Sci.* 8, pp. 19-32.
- Morrell, J. & Rodriguez-Martinez, H., 2011. Practical Applications of Sperm Selection Techniques as a Tool for Improving Reproductive Efficiency. *Veterinary Medicine International*.
- Morrier, A., Castonguay, F. & Bailey, J., 2002. Glycerol addition and conservation of fresh and cryopreserved ram spermatozoa. *Can. J. Anim. Sci.* 82, pp. 347-356.
- Morton, K., 2008. Developmental capabilities of embryos produced in vitro from prepubertal lamb oocytes. *Reprod. Dom. Anim.* 43 (Suppl. 2), pp. 137-143.
- Morton, K. és mtsai., 2005. Repeat ovum-pick up and in vitro embryo production from adult ewes with and without FSH treatment. *Reprod. Dom. Anim.* 40, pp. 422-428.
- Morton, K., Maxwell, W. & Evans, G., 2008. Effect of aspiration pressure during oocyte harvesting on oocyte recovery and in vitro development of ovine oocytes. *Reprod. Dom. Anim.* 43, pp. 106-110.
- Mossa, F. és mtsai., 2006. Follicle number affects in vitro developmental competence of sheep oocytes. In: actas del XIV Congreso Internacional de la Federación Mediterránea de Sanidad y Producción de Rumiantes, Lugo-Santiago de Compostela, 12-15 de julio de 2006: ismeretlen szerző, pp. 545-549.
- Mujitaba, M. és mtsai., 2022. Alternative Opportunities to Collect Semen and Sperm Cells for Ex Situ In Vitro Gene Conservation in Sheep. *Agriculture*, 12. kötet.
- Naitana, S. és mtsai., 1997. Polyvinyl alcohol as a defined substitute for serum in vitrification and warming solutions to cryopreserve ovine embryos at different stages of development. *Anim. Reprod. Sci.*, 48. kötet, pp. 247-256.
- Nedambale, T. és mtsai., 2004. Comparison on in vitro fertilized bovine embryos cultured in KSOM or SOF and cryopreserved by slow freezing or vitrification. *Theriogenology* 62, pp. 437-449.
- Neila-Montero, M. és mtsai., 2021. Centrifugal force assessment in ram sperm: identifying species-specific impact. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 63. kötet.
- Neila-Montero, M. és mtsai., 2022. An optimized centrifugation protocol for ram sperm ensuring high sample yield, quality and fertility. *Theriogenology*, 191. kötet, pp. 179-191.
- Niu, Y., Greube, A., Ji, W. & Jewgenow, K., 2006. The application of in vitro sperm competition test to evaluate the impact of ZP-derived peptides on fertilization capacity of cat sperm. *Theriogenology* 66, pp. 989-995.
- O'Brien, J. és mtsai., 1997. In vitro and in vivo developmental capacity of oocytes from prepubertal and adult oocytes. *Theriogenology* 47, pp. 1433-1443.
- Oláh, J., 2002. A hortobágyi rackajuh. *Magyar Állattenyésztők Lapja*, 9. kötet, pp. 12-12.

- Ollero, M., Perez-Pe, R., Muino-Blanco, T. & Cebrian-Perez, J., 1998. Improvement of ram sperm cryopreservation protocols assessed by sperm quality parameters and heterogeneity analysis. *Cryobiol.* 37, pp. 1-12.
- Pamungkas, F., Setiadi, M. & Karja, N., 2012. Characteristics and in Vitro Fertilization Ability of Ram Spermatozoa: Comparison of Epididymal and Ejaculated Spermatozoa. *Media Peternakan* , Issue <https://doi.org/10.5398/medpet.2012.35.1.38>.
- Papadopoulos, S. és mtsai., 2002. Embryo survival and recipient pregnancy rates and transfer of fresh or vitrified, in vivo or in vitro produced ovine blastocysts. *Anim. Reprod. Sci.* 74, pp. 35-44.
- Papis, K., Shimizu, M. & Izaïke, Y., 2000. Factors affecting the survivability of bovine oocytes vitrified in droplets. *Theriogenology*, 54. kötet, pp. 651-658.
- Paramio, M.-T. & Izquierdo, D., 2014. Current Status of In Vitro Embryo Production in Sheep and Goats. *Reprod Dom Anim* , 49. kötet, p. 37-48.
- Parrish, J. és mtsai., 1986. Bovine in vitro fertilization with frozen-thawed semen. *Theriogenology*, 25. kötet, pp. 591-600.
- Parrish, J., Krogenaes, A. & Susko- Parrish, J., 1995.): Effect of bovine sperm separation by swimup or percoll on success of in vitro fertilization and embryo development. *Theriogenology*, p. 859-869.
- Paulenz, H., Soderquist, L., Perez-Pe, R. & Berg, K., 2002. Effect of different extenders and storage temperatures on sperm viability of liquid ram semen. *Theriogenology* 57, pp. 823-836.
- Pawshe, C. és mtsai., 1996. Comparison of various maturation treatments on in vitro maturation of goat oocytes and their early embryonic development and cell numbers. *Theriogenology* 46, pp. 971-982.
- Pawshe, C., Totey, S. & Jain, S., 1994. A comparison of 3 methods of recovery of goat oocytes for in vitro maturation and fertilization. *Theriogenology* 42, pp. 117-125.
- Pereira, R. & Marques, C., 2008. Animal oocyte and embryo cryopreservation. *Cell Tissue Banking.* 9, pp. 267-277.
- Peris, S., Morrier, A., Dufour, M. & Bailey, J., 2004. Cryopreservation of ram semen sperm DNA damage: Relationship between spermandrological parameters and the sperm chromatin structure assay. *J. Androl.* 25, pp. 224-233.
- Royere, D., Barthelemy, C., Hamama, S. & Lansac, J., 1996. Cryopreservation of spermatozoa: a 1996 review.. *Hum. Reprod.* 2 , pp. 553-559.
- Salamon, S. & Maxwell, W., 1995b. Frozen storage of ram semen. II. Causes of low fertility after cervical insemination and methods of improvement. *Anim. Reprod. Sci.* 38, pp. 1-36.
- Salamon, S. & Maxwell, W., 2000. Storage of ram semen. *Anim., Reprod. Sci.*, 62. kötet, pp. 77-111.

- Salamon, S. & Marrant, A., 1963. A comparison of two methods of artificial breeding in sheep. *Aust. J. Exp. Agric. Anim. Husb.* 3, pp. 72-77.
- Saleh, R. & Agarwal, A., 2002. Oxidative stress and male infertility: from research bench to clinical practice. *J. Androl.*, 23. kötet, pp. 737-752.
- Santos-Neto, P. és mtsai., 2017. Embryo survival and birth rate after minimum volume vitrification or slow freezing of in vivo and in vitro produced ovine embryos. *Cryobiology*, 78. kötet, pp. 8-14.
- Schoevers, E., Colenbrander, B. & Roelen, B., 2007. Developmental stage of the oocyte during antral follicle growth and cumulus investment determines in vitro embryo development of sow oocytes. *Theriogenology* 67, pp. 1108-1122.
- Seidel, G. J. & Garner, D., 2002. Current status of sexing mammalian spermatozoa. *J. Reprod. Fertil.* 124, pp. 733-743.
- Shakeri, M., Roshanfekr, H., Mamoei, M. & Mirzadeh, K., 2008. Effect of Epididymis Handling Conditions on the Quality of Ram Spermatozoa Recovered Post-Mortem. *Asian Journal of Animal and Veterinary Advances*, 3. kötet, pp. 400-408.
- Sharkey, S., Blackburn, H. & Kimberling, C., 2002. The effects of extender and freeze rate on pre-and post-thaw CASA parameters of warhill ram semen. *Cryobiol.* XVII.
- Shelton, M., 1995. *Harnessing the biological potential of sheep in providing protein for growing world population*, hely nélk.: *J. Anim. Sci.* 73, 243.
- Shi, L. és mtsai., 2009. Effect of ovarian cortex cells on nuclear maturation of sheep oocytes during in vitro maturation. *Anim. Reprod. Sci.* 113, pp. 299-304.
- Shirazi, A., Shams-Esfandabadi, N. & Hosseini, S., 2005. A comparison of two recovery methods of ovine oocytes for in vitro maturation. *Small Rumin. Res.* 58, pp. 283-286.
- Shirazi, A. és mtsai., 2010. Vitrification of in vitro produced ovine embryos at various developmental stages using two methods. *Cryobiology*, 60. kötet, pp. 204-210.
- Sirard, M., Richard, F., Blondin, P. & Robert, C., 2006. Contribution of oocyte to embryo quality. *Theriogenology* 65, pp. 126-136.
- Soderquist, L., Madrid-Bury, N. & Rodriguez-Martinez, H., 1997. Assessment of sperm ram membrane integrity following different thawing procedures. *Theriogenology* 48, pp. 1115-1125.
- Soler, A., Pérez-Guzmán, M. & Garde, J., 2003. Storage of red deer epididymides for four days at 5 degrees C: effects on sperm motility, viability, and morphological integrity. *J. Exp. Zool. A. Comp. Exp. Biol.* 295a, pp. 188-199.
- Somfai T., B. S. N. S. P. A. I. J. B. B. G. E. K. A., 2002. Effect of swim up and Percoll treatment on viability and acrosome integrity of frozen-thawed bull spermatozoa. *Reprod. Domest. Anim.*, pp. 285-90.

- Sonmez, M. & Demirci, E., 2004. The effect of ascorbic acid on the freezability of ram semen diluted with extenders containing different proportions of glycerol. *Turk. J. Vet. Anim. Sci.* 28, pp. 893-899.
- Soylu, M. és mtsai., 2007. Effects of various cryoprotective agents and extender osmolality on post-thawed ram semen. *Bull. Vet. Inst. Pulawy* 51, pp. 241-246.
- Stanic, P. és mtsai., 2000. Comparison of protective media and freezing techniques for cryopreservation of human semen. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* 91, pp. 65-70.
- Sugulle, A., Bhuiyan, M. & Shamsuddin, M., 2006. Breeding soundness of bulls and the quality of their frozen semen used in cattle artificial insemination in Bangladesh. *Livestock Res. Rur. Dev.* 18.
- Sundararaman, M., Kalatharan, J. & Edwin, M., 2007. Attempts to achieve semen collections from incapacitated Boer bucks by electro-ejaculation. *Asian J. Anim. Vet. Adv.* 2, pp. 244-246.
- Suppawiwat, P., Chatdarong, K., Sirivaidyapong, S. & Lohachit, C., 2006. Freezing of epididymal spermatozoa from dogs after cool storage for 2 or 4 days. *Theriogenology* 66, pp. 1633-1636.
- Sutton, M., Gilchrist, R. & Thomson, J., 2003. Effects of in-vivo and in-vitro environments on the metabolism of the cumulus-oocyte complex and its influence on oocyte developmental capacity. *Hum. Reprod. Update* 9, pp. 35-48.
- Tajik, P. & Shams Esfandabadi, N., 2003. In vitro maturation of caprine oocytes in different culture media. *Small Rumin. Res.* 47, pp. 155-158.
- Tervit, H. & Gold, P., 1984. Deep-freezing of sheep embryos. *Theriogenology*, 21. kötet, p. 268.
- Tervit, H., Whittingham, D. & Rowson, L., 1972. Successful culture in vitro of sheep and cattle ova. *J. Reprod. Fertil.* 30. kötet, pp. 493-7.
- Thuwanut, P. és mtsai., 2010. Cryopreservation of epididymal cat spermatozoa: effects of in vitro antioxidative enzymes supplementation and lipid peroxidation induction. *Theriogenology* 73, pp. 1076-1087.
- Tittarelli, C. és mtsai., 2006. Effect of storage media and storage time on survival of spermatozoa recovered from canine and feline epididymides. *Theriogenology*, 66(6-7). kötet, pp. 1637-40.
- Vajta, G., 2000. Vitrification of oocytes and embryos of domestic animals. *Anim. Reprod. Sci.* 60/61, pp. 357-364.
- Vajta, G. és mtsai., 1998. Open pulled straw (OPS) vitrification: A new way to reduce cryoinjuries of bovine ova and embryos. *Molecular Reproduction and Development*, 51. kötet, pp. 53-58.
- Vass, N., 2014. *A juh embrióátültetés eredményességét befolyásoló tényezők*. Debrecen: ismeretlen szerző
- Veress, L., Dunka, B. & Oláh, J., 2005. *Ősi magyar juhaink megmentése*. [Online] Available at: <https://adoc.pub/queue/si-magyar-juhaink-megmentese.html> [Hozzáférés dátuma: 2023].
- Veress, L., 1996. Mit tud a cigája Erdélyben és itthon?. *Magyar Mezőgazdaság*, 42. kötet, p. 19.

- Vieira, L. és mtsai., 2012. Equine spermatozoa stored in the epididymis for up to 96 h at 4 °C can be successfully cryopreserved and maintain their fertilization capacity. *Anim. Reprod. Sci.* 136, pp. 280-288.
- Viveiros, A., So, N. & Komen, J., 2000. Sperm cryopreservation of African catfish, *Clarias gariepinus*: cryoprotectants, freezing rates and sperm: egg dilution ratio. *Theriogenology* 54, pp. 1395-1408.
- Waheed, M., Al-Ekna, M. & El-Bahr, S., 2011. Some biochemical characteristics and preservation of epididymal camel spermatozoa (*Camelus dromedarius*). *Theriogenology* 76, pp. 1126-1133.
- Walker, S., Hill, J., Kleemann, D. & Nancarrow, C., 1996. Development of ovine embryos in synthetic oviductal fluid containing amino acids at oviductal fluid concentrations. *Biol. Reprod.* 55, pp. 703-708.
- Wang, S. és mtsai., 1998. A protocol for in vitro maturation and fertilization of sheep oocytes. *Small Rumin. Res.* 29, pp. 83-88.
- Wang, Z., Xu, Z. & Yu, S., 2007. Effects of oocyte collection techniques and maturation media on in vitro maturation and subsequent embryo development in Boer goat. *Czech. J. Anim. Sci.* 52, pp. 21-25.
- Wani, A. és mtsai., 2012. Effect of cysteamine and epidermal growth factor (EGF) supplementation in maturation medium on in vitro maturation, fertilization and culturing of embryos in sheep. *Small Ruminant Research*, 106. kötet, pp. 160-164.
- Wani, N., Wani, G., Khan, M. & Sadiqi, M., 1999. Effects of different factors on the recovery rate of oocytes for in vitro maturation and in vitro fertilization procedures in sheep. *Small Rumin. Res.* 34, pp. 71-76.
- Wani, N., 2002. In vitro maturation and in vitro fertilization of sheep oocytes. *Small Rumin. Res.* 44, pp. 89-95.
- Wani, N., Wani, G., Khan, M. & Salahudin, S., 2000. Effect of oocyte harvesting techniques on in vitro maturation and in vitro fertilization in sheep. *Small Rumin. Res.* 36, pp. 63-67.
- Watson, P., 2000. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Anim. Reprod. Sci.* , 60-61. kötet, pp. 481-492.
- Wheeler, M. és mtsai., 2006. Application of sexed semen technology to in vitro embryo production in cattle. *Theriogenology* 65, pp. 219-227.
- Woelders, H., Matthijs, A. & Engel, B., 1997. Effects of trehalose and sucrose, osmolality of the freezing medium and cooling rate on viability and intactness of bull sperm after freezing and thawing. *Cryobiol.* 35, pp. 93-105.
- Wulster-Radcliffe, M. és mtsai., 2001a. Semen collection from rams: Artificial vagina versus a vaginal collection vial. *Proceedings, Western Section, Am. Soc. Anim. Sci.* 52., pp. 171-176.
- Wulster-Radcliffe, M., Williams, M., Stellflug, J. & Lewis, G., 2001b. Technical note: Artificial vagina vs a vaginal collection vial for collecting semen from rams. *J. Anim. Sci.* 79, pp. 2964-2967.
- Zhu, S. E. és mtsai., 2001. Vitrification of in vivo and in vitro produced ovine blastocysts. *Anim Biotech.*, pp. 193-203.

9. MELLÉKLETEK

Kész táptalajok

IVF BIOSCIENCE®

AZ IVF BIOSCIENCE egy komplett, optimalizált rendszer az IVEP folyamat minden lépéséhez, használatra kész, részletes protokollal ellátva. Tartalmazza a petesejteket érlelő táptalajt (BO-IVM), a fertilizációs médiumot (BO-IVF), a spermamosáshoz szükséges médiumot (SemenPrep), és az embriótenyésztő táptalajt (BO-IVC), illetve a petesejtek és embriók mosásához szükséges médiumot (WASH) és olajat (OIL).

Táptalajok

1. Tyrode's médium (TALP) 200mL:

| | |
|--|------------------|
| Kálium - Klorid KCl (Merck 4936) | 0,048 g/200 ml |
| Nátrium - Klorid NaCl (Merck 6404) | 1,3332 g/200 ml |
| Nátrium-dihidrogén-foszfát-monohidrát $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ (Merck 6346) | 0,0082 g/200 ml |
| Kalcium-klorid-dihidrát $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ (Merck 2382) | 0,06 g/200 ml |
| Magnézium-klorid-hexahidrát $\text{MgCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ (Merck 5833) | 26 0,02 g/200 ml |
| Fenolvörös (sejtkultúra-tesztelt) (Sigma P1503) | 0,4 ml/200 ml |
| H ₂ O (embrió-transzferhez használható) (Sigma W1503) | 199,6 ml/200 ml |

A Tyrode's alpmédium (TALP) ozmolaritása 230 mOsm. Hűtőszekrényben 2-4 °C közötti hőmérsékleten maximum egy hónapig tároltuk.

2. STALP-BSA

100 ml alaptáptalajt (TALP) az alábbi összetevőkkel egészítettem ki:

| | |
|---|-----------------|
| Nátrium Bikarbonát NaHCO_3 (Sigma S5761) | 0,2166 g/100 ml |
| Nátrium-piruvát $\text{C}_3\text{H}_3\text{O}_3\text{Na}$ (Sigma P3662) | 0,0114 g/100 ml |

| | |
|---|-------------------|
| Nátrium-DL-laktát $\text{CH}_3\text{CH}(\text{OH})\text{COONa}$ (laktát szirup) (Sigma L7900) | 0,3066 ml/100 ml |
| Gentamicin (10mg/ml) (Gibco) | 0,4934 ml/ 100 ml |
| HEPES (Sigma H3375) | 0,16 g/100 ml |

3. *Sp-TALP médium (STALP)*

50 ml STALP-BSA táptalajt az alábbi összetevőkkel egészítettem ki:

| | |
|---|--------------|
| Szarvasmarha szérumalbumin (BSA fraction V. – Sigma A 9647) | 0,14 g/50 ml |
| CPP | 0,05 g/50 ml |

4. *módosított Sp-TALP médium (USTALP)*

50 ml STALP-BSA táptalajt az alábbi összetevőkkel egészítettem ki:

| | |
|--|--------------|
| Szarvasmarha szérumalbumin (BSA Fatty Acid Free – Sigma A8806) | 0,14 g/50 ml |
| CPP | 0,05 g/50 ml |

5. *IVF TALP médium (IVFTALP)*

50 ml STALP-BSA táptalajt az alábbi összetevőkkel egészítettem ki:

| | |
|--|--------------|
| Szarvasmarha szérumalbumin (BSA Fatty Acid Free – Sigma A8806) | 0,3 g/50 ml |
| CPP | 0,05 g/50 ml |

A készített táptalajok pH-ja 7,2-7,3 között változott. A Sp-TALP médiumot hűtőszekrényben 2-4 °C közötti hőmérsékleten tároltuk, és a készítéstől számított maximum két hétig használtuk.

6. *TCF 100 ml:*

| | |
|----------------------------|---------|
| Trisma Base (Sigma T6066): | 3,028 g |
|----------------------------|---------|

| | |
|----------------------------|--------|
| Citric Acid (Sigma C0759): | 1,7 g |
| D-Fructose (Biochemem) | 1,25 g |
| Desztillált víz: | 100 ml |

7. *Andromed*®:

Tojássárgája mentes hígítóközeg bikasperma és egyéb kérődzők spermájának friss minta eltartására és mélyhűtésére. Állati eredetű összetevőket nem tartalmaz, állandó, optimális mélyhűtési eredményeket biztosít mind ejakulált, mind mellékhere eredetű spermiumok számára is.

NYILATKOZAT

Alulírott *Debnár Viktória Johanna*, a Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem, *Szent István* Campus, *Mezőgazdasági biotechnológus* szak nappali/levelező* tagozat végzős hallgatója nyilatkozom, hogy a dolgozat saját munkám, melynek elkészítése során a felhasznált irodalmat korrekt módon, a jogi és etikai szabályok betartásával kezeltem. Hozzájárulok ahhoz, hogy Záródolgozatom/Szakdolgozatom/Diplomadolgozatom egyoldalas összefoglalója felkerüljön az Egyetem honlapjára és hogy a digitális verzióban (pdf formátumban) leadott dolgozatom elérhető legyen a témát vezető Tanszéken/Intézetben, illetve az Egyetem központi nyilvántartásában, a jogi és etikai szabályok teljes körű betartása mellett.

A dolgozat állam- vagy szolgálati titkot tartalmaz: igen nem*

Kelt: 2023. év 05. hó 07. nap



Hallgató

NYILATKOZAT

A dolgozat készítőjének konzulense nyilatkozom arról, hogy a Záródolgozatos/Szakdolgozatos/Diplomadolgozatos áttekintetem, a hallgatót az irodalmi források korrekt kezelésének követelményeiről, jogi és etikai szabályairól tájékoztattam.

A Záródolgozatos/Szakdolgozatos/Diplomadolgozatos záróvizsgán történő védésre javaslom / nem javaslom*.

A dolgozat állam- vagy szolgálati titkot tartalmaz: igen nem*

Kelt: 2023. év 07. hó 08. nap



Belső konzulens

***Kérjük a megfelelőt aláhúzni!**