

SZAKDOLGOZAT

Kovács Márta Melinda

2023



Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem

Szent István Campus

Növénytermesztési-tudományok Intézet

Mezőgazdasági mérnöki alapképzési szak

Az embriológiai technikák optimalizálása pronukleáris és kétsejtes sejtmagi mikroinjektálással előállított génmódosított egerek esetében

Belső konzulens:	Dr. Gócza Elen MTA levelező tagja, tudományos tanácsadó, tanszékvezető
Belső konzulens intézete/tanszéke:	MATE Genetika és Biotechnológia Intézet, Állatbiotechnológia Tanszék
Külső konzulens:	Dr. Erdélyi Ferenc részlegvezető, Kísérleti Orvostudományi Kutatóintézet
Készítette:	Kovács Márta Melinda

Gödöllő

2023

Tartalomjegyzék

Jelölések és rövidítések jegyzéke	3
1. Bevezetés és célkitűzések	4
2. Szakirodalmi áttekintés	7
2.1. Az egér, mint kísérleti állat fontossága a kutatásokban	7
2.2. Egerek szaporodásbiológiai jellemzői	8
2.3. Az embrionális fejlődés korai szakaszai	9
2.4. Megtermékenyített zigóta stádiumú embrió nyerése hagyományos pároztatással	13
2.5. Egér embrió előállítás IVF módszerrel	14
2.6. Mikroinjektálás.....	17
2.7. Embrió beültetés	20
2.8. Kórokozómentesítés embriótranszferrel (rederiválás).....	21
3. Alkalmazott anyagok és módszerek	23
3.1. A munkához felhasznált génmódosított és genetikailag nem módosított egértörzsek	23
3.1.1. C57BL/6	23
3.1.2. FVB.129P2-Pde6b+ Tyrc-ch/AntJ (FVB/Ant)	24
3.1.3. B6BALB/cF1	24
3.1.4. Génmódosított vonalak.....	25
3.2. Az állattartás körülményei	25
3.3. Alkalmazott anyagok, oldatok, hormonok	26
3.4. Alkalmazott protokollok	27
3.4.1. Hormonkezelés	27
3.4.2. Hagyományos pároztatás	27
3.4.3. <i>In vitro</i> fertilizáció	28
3.4.4. Rederiválás	29
3.4.5. Álvemhes nőstények létrehozása	30
3.4.6. Beültetés	30
4. Eredmények és értékelésük	31
4.1. IVF-hez használt donor nőstény egerek szuperovuláltatása.....	31
4.2. Beültetés	33
4.3. Recipiens nőstényekkel való bánásmód	35
4.4. Vemhesülés, születés.....	36
4.5. Született állatok felnevelése	41
5. Következtetések és javaslatok	43

6. Összefoglalás	45
7. Köszönetnyilvánítás.....	47
8. Irodalomjegyzék	48
9. Ábrák és táblázatok jegyzéke.....	55
10. Mellékletek	57
11. Hallgatói nyilatkozat.....	58
12. Konzulensi nyilatkozat.....	59

Jelölések és rövidítések jegyzéke

IVF - *In Vitro* Fertilization – *in vitro* fertilizáció

ET - Embryo Transfer – embriótranszfer

GSH - Glutathione – glutation

FSH - Follicle Stimulating Hormone – follikulus-stimuláló hormon

LH - Luteinizing hormone – luteinizáló hormon

HTF - Human Tubal Fluid – humán tubuláris folyadék

KOKI - Kísérleti Orvostudományi Kutatóintézet

OGR - Orvosi Géntechnológiai Részleg

PM - Preincubation Medium – preinkubációs médium

PMI – Pronuclear Microinjection – Pronukleáris mikroinjektálás

PMSG - Pregnant Mare Serum Gonadotropin – vemhes kanca szérum gonadotropin

hCG - Human Chorionic Gonadotropin – humán chorion-gonadotropin

SPF - Specified Pathogen Free – specifikált patogén-mentes

MD - Minimal Disease – alacsony betegségsszintű, járványos betegségektől mentes

1. Bevezetés és célkitűzések

A témám megválasztása praktikussági szempontok alapján történt, emellett fontosnak tartom, hogy a feladataim során a tőlem telhető legjobb teljesítményt nyújtsam. Jelenleg a Kísérleti Orvostudományi Kutatóintézetben (KOKI) dolgozom, 2019 októberétől tevékenykedem az intézet Orvosi Géntechnológiai Részleg embriológiai laborjában (1.ábra).

A Kísérleti Orvostudományi Kutatóintézet fő kutatási témája az idegrendszer vizsgálata és megértése annak érdekében, hogy növelje ismereteinket az agyról, és hozzájáruljon a társadalom számára hatalmas terhet jelentő, az idegrendszerrel összefüggésbe hozható betegségek gyógyításához, valamint elősegítse az orvos-diagnosztikai és az agykutatási módszerek fejlődését.

Szakedolgozatom kutatásait az Orvosi Géntechnológiai Részlegben (OGR) végeztem, ahol az utóbbi 3-4 év munkájának megfigyelései és tapasztalatai segítettek hozzá az embriológiai technikák módszereinek kifinomítására és optimalizálására tett kísérletekhez. A dolgozatomban ezeknek a megfigyeléseknek az ismertetésével foglalkozom részletesebben.



1. ábra Embriológia labor (Forrás: saját fotó)

Munkám során kísérleti állatokkal, egerekkel foglalkozom. A dolgozatom szempontjából fontos feladataim közé tartozik genetikailag módosított állatok előállítása különböző módszerekkel, és az ezt övező különböző tevékenységek. A teljes folyamat hosszú időt és sok energiát vesz igénybe, ennek tükrében különösen fontos, hogy minden munkafolyamat zökkenőmentesen menjen végbe. Ezek között szerepel többek között az állatok előkészítése, hormonkezelése, majd természetes pároztatása, illetve *in vitro* fertilizációja, az embriók előkészítése és mikroinjektálása, majd az ezt követő embriótranszfer. Továbbá a beültetett recipiens állatok folyamatos monitorozása és a megszülető állatok figyelemmel kísérése olyan szempontból, hogy életképesek-e az utódok, sikeresnek mondható-e a mikroinjektálással elérhető génátvitel, illetve képesek-e tovább örökíteni a transzgént. Ezen kívül több kisebb-nagyobb alfeladattal is számolni kell, amikkel együttesen összességében több heti, havi munkát igényel a technológia az elejétől a végéig. Biológiai folyamatok lévén minden egyes részfolyamatnak a sikeres végbemenetele számtalan tényező hatásától függhet, problémák szinte bárhol felléphetnek, ami az eredményesség szempontjából hatalmas befolyással bír.

Szakterületem céljaként a munkák során felmerülő problémakörök feltárását, adatbázisokba rögzítést, a szükséges következtetések levonását, majd ennek eredményeként az embriológiai technikák optimalizálását jelölöm meg.

A szakterület empirikussága szempontjából fontosnak tartom az állatok élettani, biológiai megfigyelését, az embriók életképességét befolyásoló tényezők figyelemmel kísérését, és dokumentálását, hogy munkámat segítve ezek alapján már tényszerű következtetéseket vonhassak le. Olyan vizsgálatok végzését tűztem ki célul, melyek bizonyítják a folyamatok eredményességét, vagy ezzel szemben a negatívan ható körülményeket tárják fel, így ezek elkerülésével pozitívan befolyásolhatjuk munkánk sikerességét, ezzel meggyorsítva a genetikailag módosított egerek előállítását.

A megfigyelések eredményeit adatbázisokba rögzítettem, és kiértékeltem. Az KOKI OGR szolgáltató tevékenységet folytat, ezért az aktuális munkákhoz kellett igazítani a kísérletek elvégzését. A projektek adottak voltak a génmódosított modellek létrehozását illetően is. Ezek között voltak Sleeping Beauty transzpozáz és integráz mediált transzgenézis kísérletek, CRISPR/Cas9 genom módosítások, a használt vektorok mérete a kis méretű plazmidoktól a rekombináns BAC klónig terjedt. Egy-egy kísérlet többszöri megismétlése az ajánlott mintaszámok elérése érdekében emiatt korlátozott volt. Mivel a munkánk része a genetikailag módosított egérvonalak kórokozómentesítése, vonalak feltámasztása fagyasztott spermiumból

és ehhez a mikroinjektáláshoz hasonlóan szükséges embriók preparálása, majd recipiens anyákba történő beültetése, ezeket az adatokat is belevettem a dolgozat megírásához.

A vizsgálatok tárgya a folyamatok során felmerülő általános problémák és azokra való megoldások keresése. A dolgozatomban arra a kérdésre keresem a választ, hogyan lehet a módszerek optimalizálásával, új technikák kipróbálásával és alkalmazásával hatékonyabbá tenni a munkafolyamatokat az első lépéstől az utolsóig. A hangsúlyt arra a kérdésre fektetem, hogy lehet-e a recipiens anyák vemhesülési arányát, valamint a beültetett zigótákból és kétsejtes embriókból megszületett utódok számát az embriológiai technikák finomításával növelni. Ehhez a 2022. januártól 2023. szeptember végéig terjedő időszak 111 mikroinjektálási, 26 kórokozómentesítési, 16 vonalfellesztési munkáink adatait használtam fel. A dolgozatban szereplő munkák a PE/EA/1561-5/2019 számú állatkísérletes engedélyben foglaltak szerint történtek.

2. Szakirodalmi áttekintés

2.1. Az egér, mint kísérleti állat fontossága a kutatásokban

A modellszervezeteknek a kutatásokban nélkülözhetetlen szerepe van abban, hogy betekintést nyerhessünk más szervezetek életfolyamataiba. Ehhez biológiai jelenségeket vizsgálnak rajtuk, és vannak le ezekből következtetéseket (Fields és Johnston, 2005). A modellek alkalmazása a tudományos fejlődést szolgálja, ezen keresztül emberi gének működését, kifejeződését, funkcióját tanulmányozhatják, és betegségek okait, vagy lehetséges gyógymódjait deríthetik fel. Bizonyos esetekben ennek szükségessége elengedhetetlen, főként akkor, amikor emberkísérletek eredménytelenek vagy etikátlanok lennének. Az életjelenségek megbízhatóan csak élő szervezetben tanulmányozhatóak, tehát a modellszervezetek létrehozása és tanulmányozása fontos lépés a biológia tudományának fejlődésében, azonban figyelembe kell vennünk a fajok közti genetikai eltéréseket és ebből következően a modellszervezetek és más szervezetek közti általánosításokat is (Fox, 1986).

A kísérleti állatok akkor használhatóak megbízhatóan emberi szervezet modellezésére, ha funkcióikban nagymértékű hasonlóság van, és ezek jól mérhetőek. Az egerekben (*Mus musculus*) a betegségekkel összefüggésbe hozható gének 90%-a azonos az emberben előforduló génekkel, amely alátámasztja az egerek modellszervezetként való felhasználását az emberi betegségek vizsgálatában (Mayor, 2002).

Az egér használata kutatási célokra a biológia, gyógyszerfejlesztés és orvostudomány területén széles körben elterjedt, mivel számos előnyt kínál a kutatók számára. Az egerek kiváló modelleket jelentenek a tudományos kutatásban, számos előnye van az emberrel való hasonlóságon kívül. Régóta tenyésztik, ezért számos jól definiált törzse ismert. Rövid életciklusuknak és generációs idejüknek köszönhetően rövid idő alatt nagy populációt lehet létrehozni, ami lehetővé teszi gyors kísérletek végrehajtását és a genetikai változások hosszú távú hatásainak tanulmányozását rövid időn belül. A nagy populációkkal statisztikailag értékes eredményeket lehet nyerni. Az egerek genetikai módosítása hozzájárul ahhoz, hogy specifikusan manipuláljanak bizonyos géneket, ezáltal megértsék azok szerepét a betegségek kialakulásában vagy a normális biológiai folyamatokban. Kis helyigényűek, egyszerűen tenyésztethetők és tartósan fenntarthatók laboratóriumi körülmények között, ami utat enged a hosszú távú kísérleteknek és a genetikai vonalak stabil fenntartásának.

A kísérleti eredményeknek megismételhetőnek kell lenniük, ezért adott célnak megfelelően, genetikailag minél inkább azonos állatok használatát kívánják meg a kísérletek. A vizsgálat tárgyköréhez igazítva pedig genetikailag más és más vonalak létrehozására van szükség. A kísérlet jellegétől függően bizonyos feltételeknek megfelelő modell állatok létrehozását kell ehhez megvalósítani, emellett törekednünk kell az azonos környezeti feltételek megteremtésére, és az állatok megfelelő gondozására is, ugyanis az állatok viselkedése nem csak genetikailag szabályozott.

Az intézetben számos egértörzs található meg eltérő tulajdonságokkal, hogy minél szélesebb körben, minél inkább specifikusan lehessen vizsgálni a betegségeket, vagy élettani folyamatokat. A genetikai eltérések a legtöbb esetben az állatok különböző érzékenységét vonja maga után, ezért bizonyos törzsek egy-egy kísérlethez alkalmasak, vagy alkalmatlanok lehetnek.

A célzott génmódosítás módszereinek kifejlesztéséhez nyitott utat a géntechnológia rohamos fejlődése. Ennek szükségessége kiemelt jelentőséggel bír különböző biológiai és élettani folyamatok megismerésében, ezáltal a humán betegségek tanulmányozásában. Egyes betegségek génmódosítással modellezhetőek, ami megkönnyíti a kísérleti állatokon való tanulmányozásukat. Ehhez géneket ütnek ki, vagy idegen géneket vihetnek be, majd az immár módosított állatokon vizsgálják a génkifejeződést és annak hatásait.

Az új vonalak előállításához *in vitro* fertilizációt hajtunk végre a hatékonyság növelése érdekében, ugyanis a természetes pároztatással szemben itt jóval magasabb az embriószámot érhetünk el. Ezzel a módszerrel előállított embriók érésüket követően azonnal, vagy mikroinjektálást követően recipiens nőtényekbe beültetve kerülnek az állatházba új vonalat létrehozva.

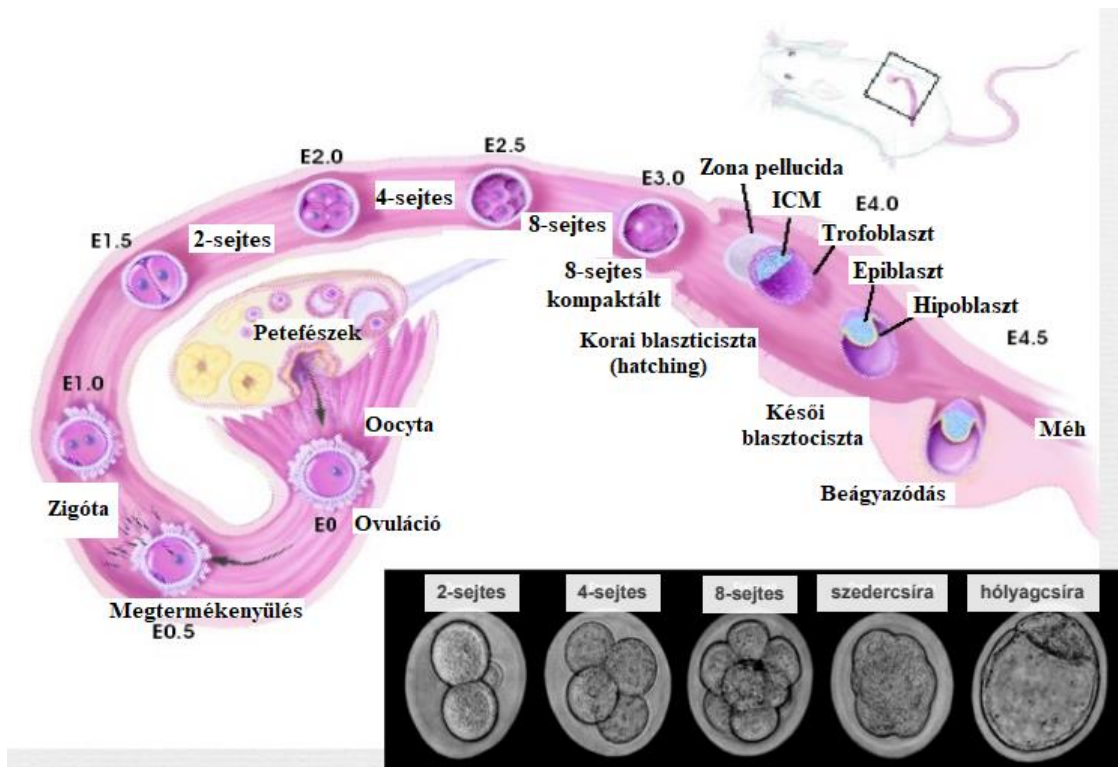
2.2. Egerek szaporodásbiológiai jellemzői

A laboratóriumi egerek szaporodásbiológiai jellemzőikben egértörzsenként és vonalanként eltérést mutathatnak, amit figyelembe kell vennünk az embriológiai munkák során, és ennek alapján kiválasztani a számunkra ideális törzset. A reprodukciós teljesítményt különböző paraméterek alapján lehet mérni. Ilyenek az ivarérettség, első párzaskori életkor, nemzett alмок száma, almonkénti kölyökszám és az, hogy egy törzs milyen gyakran párosodik termékenyen, illetve milyen arányban nevelik fel sikeresen a megszületett utódokat.

Az egerek ivarérettségüket 5-8 hetes korban érik el. Szaporodásukat ciklikusság jellemzi. Poliösztrosos faj, egész évben szaporodnak, és az ovuláció spontán történik. Ciklusok hossza 4 nap, mely során 6-16 petesejt érik meg petefészkeikben. Az ösztrosz körülbelül 12 óráig tart. A párzás bekövetkezése megerősíthető a hüvelyben lévő kopulációs dugó (Cowper-mirigy váladék), ún. „plug” jelenlétével, akár 24 órával a párzás után is. Vemhességi idejük 18-21 napra tehető, ami törzsenként eltérő lehet. Például a C57BL/6J egereknél 18,5 nap, a BALB/cJ egereknél ez 20 nap. Ellés után 14-24 órával újra ivarzanak. Utódaik száma ellésenként 2-16 kölyök. A beltenyésztett (inbred) törzsek átlagos alomnagysága 5,4 és 7,0 közötti értéket mutat. Az FVB/N ebben a kategóriában felülmúlja a többi törzset, mely 9,5 átlagos alomszámmal rendelkezik, ezzel szemben a BALB/cJ teljesít a legrosszabbul, melynél az átlagos alomméret mindössze 5,2. A szaporodási teljesítmény a beltenyésztés által leginkább befolyásolt jellemzők közé tartozik. A különböző reprodukciós és élettani paraméterekben a "hibrid vigor" következményeként a kültenyésztett (outbred) állatok és az F1 hibridek minden kategóriában felülmúlják az inbred törzseket. Általános szabályként elmondható, hogy a beltenyésztett egereknél általában hosszabb a vemhességi idő és kisebb az alom, mint a kültenyésztett és hibrid egereknél. A nőstény egerek termékenysége 7-8 hónap, ami az életkorral és a korábbi vemhességek számával egyaránt csökken. A hím egerek egész életük során termékenyek maradhatnak. Nem beltenyésztett állatok esetében a termékeny párzások gyakorisága megközelítheti a 100%-ot, az első párosodás akár öt hetes korban is megtörténhet, és az alom akár 16 kölyökből is állhat, illetve 18 hónapos korukig termékenyek maradhatnak. A 18-21 napos vemhességi idő után a megszületett utódok elválasztása 21 napos kor körül történik, és az anyák ellés után szinte azonnal képesek újra párzani, így akár 10 almot is sikeresen le lehet választani. A kölykök születéskor 0,5-1,5 g súlyúak, szőrtelenek, szemhéjuk és fülük zárt. 3 hetes korukban elválasztják őket. Ha a nőstény nem párosodik az ellés utáni ivarzás alatt, akkor az elválasztás után 2-5 nappal folytatja a ciklust (Silver, 1995).

2.3. Az embrionális fejlődés korai szakaszai

A következőekben ismertetem az embriológiai munkák során releváns korai fejlődési stádiumok időbeli lefolyását, ami meghatározza az egy-, illetve többsejtes embriók recipiens nőstény petevezetékén, vagy méhen belüli transzferének helyét. A különböző stádiumokban lévő embriók lokalizációja meghatározó tényező az implantáció eredményességét tekintve. Az embriófejlődést a 2. ábra szemlélteti.



2. ábra Az embrionális fejlődés szakaszai (Forrás: <https://stemcells.nih.gov/info/basics/stc-basics/>, módosítva Gócza Elen által)

Az embriófejlődés két szakaszra osztható: preimplantációs (3.ábra) és posztimplantációs időszakra (Kaufman, 1995). A preimplantációs időszaknak a mikroinjektálásnál és a beültetési folyamatokban van nagyobb jelentősége. A posztimplantációs időszak az embriók túlélése és megszületése szempontjából meghatározó.

A körülbelül 70 μm nagyságú egér petesejtet kívülről plazmamembrán (oolemma) borítja, azt pedig a zona pellucida veszi körül. A plazmamembrán és zona pellucida között folyadékkal telt perivitellinális tér található. A citoplazmában kortikális granulumok formájában sejtalkotók helyezkednek el, mint például a Golgi-apparátus, mitokondriumok és az endoplazmatikus retikulum. A perivitellinális térben található az első sarkitestet, melynek jelenléte a petesejt érettségére utal (Wilburn és Swanson, 2018).

A petesejtek fejlődése a petefészkekben kezdődik, melyet oogenezisnek neveznek. Ez a folyamat a tüszőben zajlik, hossza körülbelül 4 nap. A differenciálódott petesejtek fejlődésük első szakaszában mitózissal osztódnak, melyet az FSH (follikulusz-stimuláló hormon) szabályoz. Ezt követően következik be a tüszőérés, a petesejtek meiózis során diploidból haploiddá válnak, így válnak éretté. Ezt a luteinizáló hormon (LH) kiválasztása indítja be (Abel et al., 2014).

A spermatogóniumok osztódási folyamata és érése a hímek heréiben zajlik le (mitózis és meiózis). A meiotikus osztódástól számítva 16 nap múlva lesz a spermatidákból érett spermatozoa a spermiogenezis lépésein keresztül, melyek a mellékherékben (epididymis) tárolódnak, majd az ejakuláció során távoznak (Oakberg, 1956).

Az embrionális fejlődés az oocyta megtermékenyítésével kezdődik. Az egerek embriogenezisének jellemzője, hogy az embrió korai fejlődési stádiumai lassabban mennek végbe, mint más modellszervezeteknél, így például az ecetmuslicánál vagy a zebradániónál. E fajoknál a megtermékenyítést követő 24 óra elteltével az embriók jó úton haladnak afelé, hogy szabadon élő táplálkozó lárvákká váljanak és több, mint 60 000 sejtből álljanak. Ellentétben az egér embriókkal, melyek ezalatt kétsejtes állapotig jutnak el, lassan haladva a petevezetőben a méh felé, majd a megtermékenyítést követő 4,5. napon ágyazódnak be (Nagy et al., 2003).

A spermiumok és a petesejt találkozására rendszerint a petevezetékben kerül sor, ahol megtörténik a megtermékenyítés. Ennek során a spermiumok által hordozott hialuronidáz teszi lehetővé, hogy a cumuluson keresztül jutva saját maguknak utat törjenek a zona pellucida felé (Leonard et al., 1947; Austin és Braden, 1952). A petesejt zona pellucidájához kapcsolódnak a spermiumok, melyek akroszómája enzimeket termel, ezek segítik a hímivarsejtet a petesejtbe jutásban. A spermium befúródása után a petesejt kortikális szemcséket választ ki, melyek megvédik a petesejtet a további spermiumok bejutásától, ezzel elkerülve a polispermia kialakulását (Wessel et al., 2001). A zona pellucida vastagsága is megnő és megváltozik az első spermium bejutása után, így a későbbi behatolás esélye csökken (Braden, 1958).

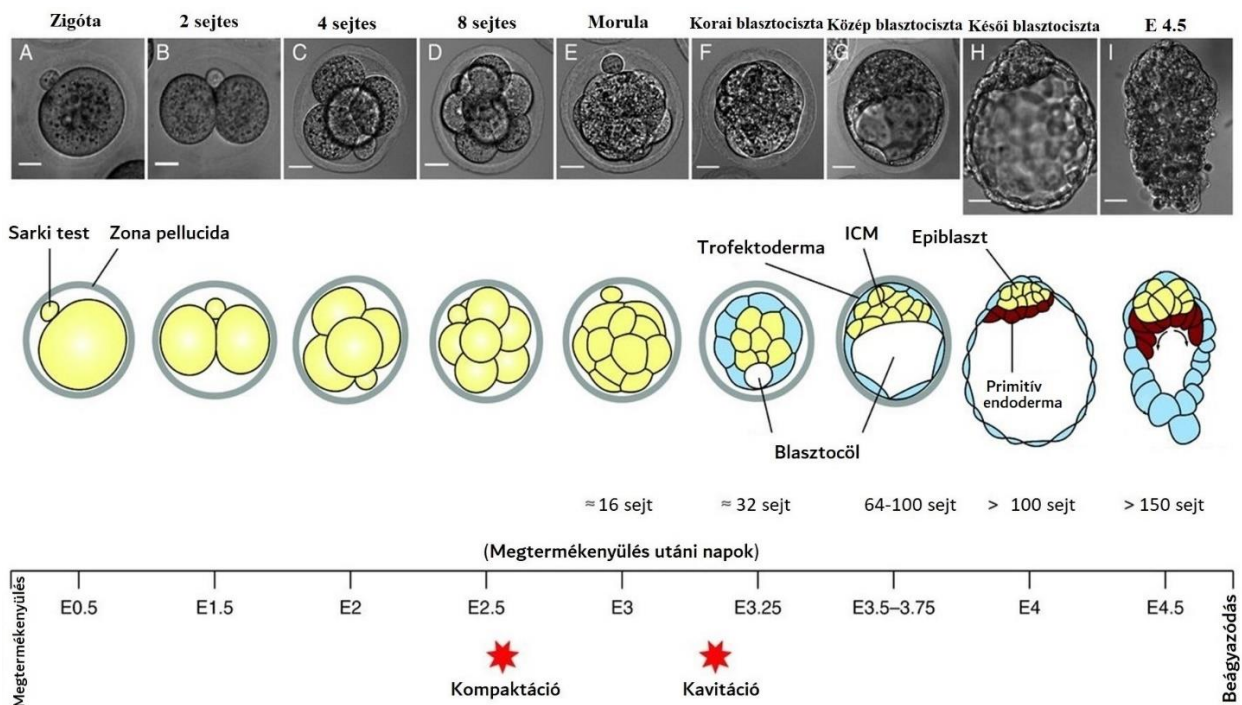
Az ejakulátumban levő spermiumok a párzást követően nem termékenyítőképesek azonnal. Bizonyos időt kell eltölteniük a női nemi utakban a termékenyítőképeség eléréséhez. Ezt az érési szakaszt nevezik kapacitációnak. A folyamat során biokémiai változások történnek a spermiumban, de morfológiai azonban nem (Balbach et al., 2020). Az érés pufferoldatban is hasonlóképpen le tud zajlani.

Az ovuláció után körülbelül 2 órával a petesejtek csomókba rendeződve a petevezetékbe vándorolnak, melynek felső, kitágult szakaszában, az ún. ampullában történik a megtermékenyítés (Braden, 1954, 1960).

Edwards és Gates (1959) megállapították, hogy az egérspermium körülbelül 1 óra alatt hatol be a cumulusba és a zónába, és 50 percig marad a perivitellináris térben. A magok 4 órával

később képződnek, és az első osztódás körülbelül 25 órával a spermium behatolása után következik be. Szinte közvetlenül a behatolás után, amely a petesejt felszínének bármely részén történhet, a vitellus kissé összezsugorodik, a zona pellucida pedig kitágul, így közöttük perivitellinális tér alakul ki (Lewis és Wright, 1935; Pincus, 1936).

Az embriófejlődés stádiumai a vemhességi idő napjaiban határozható meg, és ennek alapján használunk rá jelöléseket. Például a 0,5. napot (E0.5) aznap délre datálták, amikor az éjszakai párzást követő napon hüvelyi dugót észleltek (Turnbull, 1999).



3. ábra Az egér preimplantációs fejlődésének szakaszai (Forrás: Saiz és Plusa, 2013, szerkesztve)

A megtermékenyítést követően 3-4 órával a zigóta (E0-1.0) pronukleuszos állapotban figyelhető meg. Ekkor már jól látszódnak az apai is anyai előmagok, ami lehetővé teszi az embriók mosását, válogatását, elkülönítését a meg nem termékenyített embrióktól. Ezt követően egy érési folyamat után válnak alkalmassá pronukleáris mikroinjektálásra (PMI). A megtermékenyítés után a pronukleuszok összeérnek és körülbelül a zigóta közepén összeolvadnak, hogy kialakítsák a zigóta magját. A megtermékenyítést követő 24 óra alatt bekövetkezik az embriók osztódása, melynek során kétsejtes állapot (E1.5) alakul ki. Az embrió ekkor a petevezetékben található, amint az ampullán túl halad a méh irányába. Ebben a fázisban bizonyos génkonstrukciók beépülési hatékonyságát figyelembe véve szintén injektálhatóak kétsejtes állapotban az embriók. Az ezt követő osztódások során jut az embrió négysejtes

(E2.0), nyolcsejtes (E2.5), tizenhatsejtes állapotba. Ebben a fázisban a petevezeték méh felőli végső szakaszában találhatóak. A következő fejlődési stádiumok a morula, azaz szedercsíra (E3.0) és blasztociszta, vagyis hólyagszíra (E4.0) állapot. Az embriók ekkorra már a méh üregében helyezkednek el. A zona pellucidából kibújó blasztociszták (hatching folyamata) a méhszájon belül találhatóak (E4). A beágyazódás a 4,5. napon történik meg (E4.5) (Kaufman, 1995).

Az ezt követő embrionális fejlődési szakaszok technikailag kevésbé befolyásolhatók, ezért nem térek ki bővebben ezeknek a stádiumoknak a bemutatására. Az embriók *in vitro* tárolása során az optimális fejlődés fenntartása érdekében biztosítani kell a megfelelő körülményeket az oxigén és szén-dioxid koncentráció, valamint a hőmérséklet és megfelelő közeg kialakításával (Ali et al., 1993).

2.4. Megtermékenyített zigóta stádiumú embrió nyerése hagyományos pároztatással

A mikroinjektáláshoz, kórokozómentesítéshez, embriófagyasztáshoz szükséges embriók előállítására két módszer létezik. Az embriók keletkezhetnek természetes pároztatási módszerből, ahol a petesejtek már a pázás után megtermékenyített állapotban kerülnek kipreparálásra, vagy előállíthatóak *in vitro* fertilizációval is az oocyták preparálásával, melyeket ezt követően termékenyítenek. A fő különbség a két módszer között a petesejt-donor nőtényeket illetően az állatok kora, illetve felhasznált egyedek száma. Amíg az *in vitro* fertilizációhoz ivarérett nőtények szükségesek, a hagyományos pároztatás során fontos, hogy az állatok elérjék tenyészérettségüket. Az ivari ciklusuk különböző fázisban lehet, ezért a pároztatáshoz fontos a hormonálisan kiváltott ivarzás-szinkronizálás.

A nagy mennyiségű egyidejű megtermékenyítetlen petesejt kinyerése érdekében a donor nőtényeket előzetesen hormonkezelésnek vetjük alá. Hatására több petesejt válik le (szuperovuláció). Ezt az állatok tüszőérésének mesterséges serkentésével érhetjük el. A megfelelő életkorú (8-10 hetes) nőivarú állatokat intraperitoniálisan 5 NE PMSG (Pregnant Mare Serum Gonadotrophin; vemhes kanca szérum gonadotropin) hormonnal kezelve többszörös tüszőérést idézünk elő. Funkciója megegyezik az FSH-val. Az injekciót követő második napon (48 órával a PMSG után) a tüszők repedését és az ovulációt 5 NE hCG (humán chorion gonadotropin) hormonnal indukáljuk, melynek hatása a luteinizáló hormonnal (LH) egyezik meg. Az oocyták számában az ivarérettségi kor az egyik legfontosabb befolyásoló

tényező. Az optimális életkor a szuperovulációra törzsenként változik, de általában 3-6 hetes kor között van. Az esetek többségében a fiatalabb nőtények több petesejtet produkálnak, mint az idősebbek. Például a BALB/cGa egerek szuperovulációjának optimális kora 21 napos korra tehető. Azonban az életkor nem mindig megbízható mutatója az ivarérettségének. Az egér tápláltsági és egészségi állapota is befolyásolhatja a tüszőérést. (Behringer et al., 2018).

Kereskedelmi forgalomban kapható egy Japánban kifejlesztett, CARD HyperOva nevű ultra-szuperovulációs reagens, amely a leírások alapján 3-4-szer hatékonyabb az ovuláció kiváltásában (80 petesejt/nőtény a C57BL/6 törzsre vonatkozóan), mint a hagyományos PMSG-hCG módszer (körülbelül 20 petesejt/állat). A reagens ló korion-gonadotropin és kecske anti-inhibin antiszérum keveréke. Az inhibin csökkenti az FSH termelődését, az anti-inhibin hatásmechanizmusa szerint pedig ezt gátolja, így az FSH termelődésére serkentőleg hat (Tsuchida et al.,2021).

A hCG hormon beadását követően a nőtények egyedileg elhelyezett donor hímekhez kerülnek párosztatásra. Nem minden alkalommal mutatnak a hímek nemi aktivitást, amit a nőtények számának kalkulálásakor figyelembe kell venni. A párosodás tényét másnap délelőtt a vaginában lévő hüvelydugó jelenlétével ellenőrizzük. A párzástól számított fél nap után lehet egysejtes állapotú (E0,5-E1) embriót gyűjteni. A nőtények cervikális diszlokációját követően a petevezető ampulla szakaszából a petecsomóba ágyazva található zigóták kimoshatóak. Ehhez M2 médiumra van szükség, melybe a kipreparált petefészkek kerülnek. Ha túvel megszűrjük az ampullát, az embriócsomó kiáramlik. Hozzáadott hialuroidáz enzim segítségével a zigótákat körülölelő cumulus sejtek eltávolíthatók. Ennél a módszernél a ténylegesen megtermékenyített szuperovulált petesejtek száma a hímivarú egyedek szaporodási teljesítményétől függ. Az embriók az injektálásig vagy beültetésig paraffinolajjal fedett M2 médiumban inkubálhatóak.

2.5. Egér embrió előállítása IVF módszerrel

Az ivarsejtek természetes körülmények között az ivarszervek által védve vannak, ott fejlődnek és töltik be funkciójukat. A biotechnológia fejlődésével szükségessé vált az *in vitro* módszerek kidolgozása, melyben megvalósulhat az ivarsejtek tenyésztése, mesterséges termékenyítése. Az *in vitro* fertilizáció (IVF), az érett petesejtek spermiumokkal való megtermékenyítését jelenti laboratóriumi körülmények között („üvegben” – *in vitro*). Ez a mesterséges megtermékenyítés, más néven asszisztált reprodukció egyik hatékony formája. A technikát széles körben alkalmazzák az emberektől a laboratóriumi állatokig. Jelentősége abban

mutatkozik meg, hogy nagyszámú embriót lehet létrehozni nagy mennyiségű hím egyed felhasználása nélkül (Nagy et al., 2003). Ezáltal kiemelendő az állatkísérletekre érvényes 3R szabály egyik alaptételének (*reduction, refinement, replacement*), az állatszám csökkentésének alkalmazása (Russel és Burch, 1959). A módszer génmegőrzési célokra is használható.

Alkalmazása a természetes pároztatással szemben több szempontból is előnyös lehet. Bizonyos inkubációs időt követően a spermiumok behatolása az érett petesejtekbe szinkronban történik, tehát az embriók fejlődése nagyjából azonos időben megy végbe, ellentétben az *in vivo* megtermékenyítéssel, amikor is a természetes ovuláció általában időben elnyúlik. A módszer hatékony olyan transzgén vonalak fenntartásánál is, melyeknek természetes úton rosszak a reprodukciós mutatói a mutációk következményeképpen (Nagy et al., 2003).

Az így létrehozott embriók számos alkalmazásban felhasználhatók, beleértve a gyors állománybővítést, az azonos életkorú kísérleti állatcsoportok létrehozását, kétsejtes stádiumban történő embrió fagyasztást, vagy vitrifikációt, a kórokozómentesítést, valamint a mikroinjektáláshoz történő embrió előállítását. A módszer végrehajtható fagyasztott sperma felhasználásával is, ami által krioprezervált vonalak éleszthetőek fel. Az optimális eredmények a gyakorlaton és a részletekre való odafigyelésen múlnak (Taft, 2017).

Ennél a módszernél is a nőstények előzetes szuperovuláltatására kerül sor. Az IVF napján reggel a tüszőkből kiszabadult petesejtek, melyek petecsomóba rendeződve találhatóak ekkor, a petefészek kipreparálását követően az ampullából kimoshatóak. Az oocytákat donor hímtől nyert spermiummal termékenyítjük. 9-18 donor nősténytől megközelítőleg 300-500 oocytát tudunk gyűjteni.

Maga a megtermékenyülés az CO² inkubátorban, természetes úton jön létre a szervezetben zajló folyamatokhoz hasonlóan. Az optimális feltételeket ehhez az inkubátor (37 °C, 5% CO², >90% relatív páratartalom) és a megtermékenyítéshez szükséges médiumok biztosítják. Az embriók glutationt (GSH) tartalmazó HTF tenyésztőoldatban, ásványi olajjal (Ferticult Mineral Oil) fedve inkubálódnak.

Az *in vitro* kezelt petesejtek az *in vivo* petesejtekhez képest csökkent termékenységi és fejlődési potenciált mutatnak. A redukált glutation (GSH) hozzáadása a megtermékenyítő közeghez ennek érdekében fontos, ugyanis pozitív hatással bír az oocyták termékenységére és korai embriófejlődésére. Az oocyták és a friss spermiumok megtermékenyítési aránya nő a

GSH hozzáadásával. Mint antioxidáns, megvédi az embriókat az oxidatív stressztől, ami károsítja a mitokondriumokat és a DNS-t. Az oxidatív stressznek való kitettség hátrányosan befolyásolja a petesejtek és az embriók azon képességét, hogy a blasztociszta stádiumig fejlődjenek (Ishizuka et al., 2013).

Az embriók megfelelő fejlődése és osztódása HTF (humán tubuláris folyadék) oldatban valósul meg. Ebben a médiumban az embriók blasztociszta stádiumig képesek fejlődni. Az IVF a kedvező hatásai ellenére az ivarsejtek túlélésére és embrionális fejlődésre negatívan hathat szuboptimális körülmények kialakulásakor (Quinn et al., 1985).

A gaméták és embriók tenyésztési körülményei befolyásolhatják az embriók túlélését, ami az alkalmankénti nagyobb mennyiségű beültetett embriók és megszületett kölykök arányát emelheti. Emellett meghatározó jelentőségű a megfelelő minőségű, mennyiségű, jó motilitású sperma használata. A hímek fertilitása egyénileg változhat, amire kihatással lehet többek között a genetikai háttér, az állatok kora és kondíciója, a hőmérséklet, esetlegesen okozott stresszhatás

A megtermékenyülés határfokát több tényező befolyásolhatja. A törzsek között óriási eltérések lehetnek a szuperovulációra való reakció és megtermékenyítési arányok tekintetében (Vergara et al., 1997). A hőmérséklet-ingadozás megzavarhatja a meiotikus orsókat, ezáltal hozzájárulhat a kromoszómák rendellenes eloszlásához és a sikertelen vagy rendellenes megtermékenyüléshez (Almeida és Bolton, 1995). Fontos tehát az inkubátorok megfelelő értékeinek ellenőrzése az IVF megkezdését megelőzően. Szobahőmérsékletre kerülve az embriókat tartalmazó petricsészékben a pH néhány percen belül elkezd változni, amely csökkenti azok túlélési rátáját, ezért korlátozni kell az edények inkubátoron kívüli kezelésének idejét. Az ivarsejtekkel és embriókkal érintkezésbe kerülő reagenseket és oldatokat felhasználás előtt meg kell vizsgálni, az eltarthatósági időkre figyelni kell. A levegő rossz minősége is vezethet gyenge megtermékenyítési arányokhoz. Légtisztítók használata előnyös lehet az IVF-laboratóriumok levegőminőségének javítására. Néhány tisztító- és fertőtlenítőszer illékony lehet, amelyek szintén hátrányosan befolyásolják az IVF sikerét. A siker kulcsa az optimális környezet kialakítása, a közeg minősége, a hőmérséklet és pH érték ingadozások elkerülése az ivarsejtek kezelése során (Taft, 2017).

Az embriókat az IVF-et követően álvemhes recipiens anyákba ültetik embriótranszfer útján. Ez történhet mikroinjektálást követően, vagy anélkül, illetve elsősorban egy- és kétsejtes

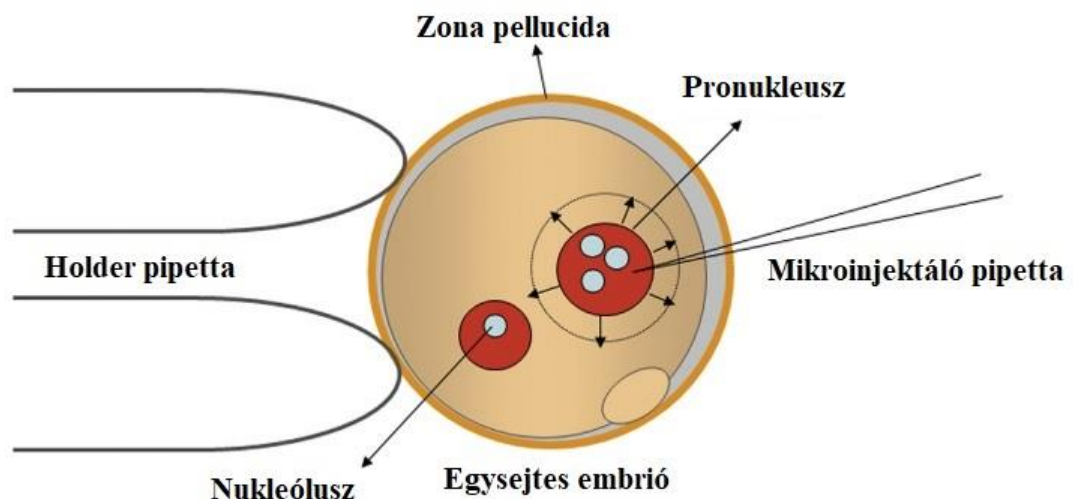
állapotban. A kétsejtes állapot előnye, hogy ilyenkor a megindult osztódási folyamat révén biztosabb az embriók túlélése és szabályos továbbfejlődése.

2.6. Mikroinjektálás

A génműködések és humán betegségek tanulmányozására különböző genetikailag módosított egérvonalakat szükséges létrehozni annak érdekében, hogy egy-egy kísérlet minél inkább egzakt és sikereseknek mondható legyen. A vonalak között vannak olyanok, amelyek hajlamosak bizonyos genetikai rendellenességekre vagy betegségekre. Ezek különböző betegségeket, gének megfelelő és hibás működését hivatottak modellezni, hogy a kutatók minél jobban megismerjék, feltérképezzék a betegségeket, tanulmányozzák azok kialakulását és hatásait, illetve hatékony terápiát, diagnosztikai eszközöket fejlesszenek ki a kórok ellen. Emellett a kutatóknak gyakran szükségük van több különböző genetikai háttérrel rendelkező egértörzsre, hogy összehasonlítsák és ellenőrizzék az eredményeket, és megbizonyosodjanak arról, hogy a megfigyelt jelenségek általánosíthatók-e. A megfelelő modell kiválasztása függ az adott kutatási céloktól és a kutatási körülményektől. Ehhez különféle transzgénikus technikákat kellett kifejleszteni. Számos fizikai és kémiai módszert dolgoztak ki a DNS sejtekbe történő bejuttatására, többek között az embrionális őssejt és kiméra egér megközelítést, szomatikus sejtmag transzfert (klónozás), elektroporációt és retrovírusos transzdukciót. A népszerűvé váló lentivírus transzdukció magasfokú hatékonyságáról ismeretes, azonban ezeknek a módszereknek is megvannak a hátrányaik. Például a lentivirális vektor csak 10 kb vagy annál kisebb transzgéneket képes befogadni, míg a mikroinjekcióval bejuttatható DNS fragment méretének lényegében nincs korlátja. Előnye továbbá a hatékonysága, valamint az, hogy citoplazmában és sejtmagban is egyaránt működik a géntranszfer. A legszélesebb körben használt módszer emiatt a pronukleáris és kétsejtes sejtmagi (5. ábra) mikroinjektálás. A módszer a rekombináns DNS technológia fejlődése következtében valósulhatott meg. A folyamat a rekombináns DNS technikával előállított DNS-konstrukció bevitelével történik a megtermékenyített oociták pronukleuszába, vagy kétsejtes embriók sejtmagvaiba (Liu et al., 2013). A cél olyan állatok létrehozása, amelyekben a kívánt DNS tartósan beépül a genetikai anyagba, tehát a genom visszafordíthatatlanul megváltozik és továbböröklődik az utód generációkban. Ehhez génkonstrukció előállítására van szükség, amely *in vivo* működőképességű (Chaible et al., 2010). A mikroinjektálás előnye a többi módszerhez képest a hatékony mivolta, a célzott génbevitellel kapcsolatos viszonylag gyors transzgénikus élőlény előállítás, és a magas továbbörökítési arány.

Mozaikosság nélküli transzgenikus egérvonalak létrehozhatóak vektor általi exogén DNS-t tartalmazó szűrőoldat segítségével. A módszer zigóták elősejtmagjaiba injektálásával történik (Gordon et al., 1980). A zigóták kinyeréséhez megtermékenyített nőtények szükségesek. Eutanáziájukat követően a petevezeték, petefészek, méhszarv preparálásával a petesejtek izolálhatóak (Conner, 2004).

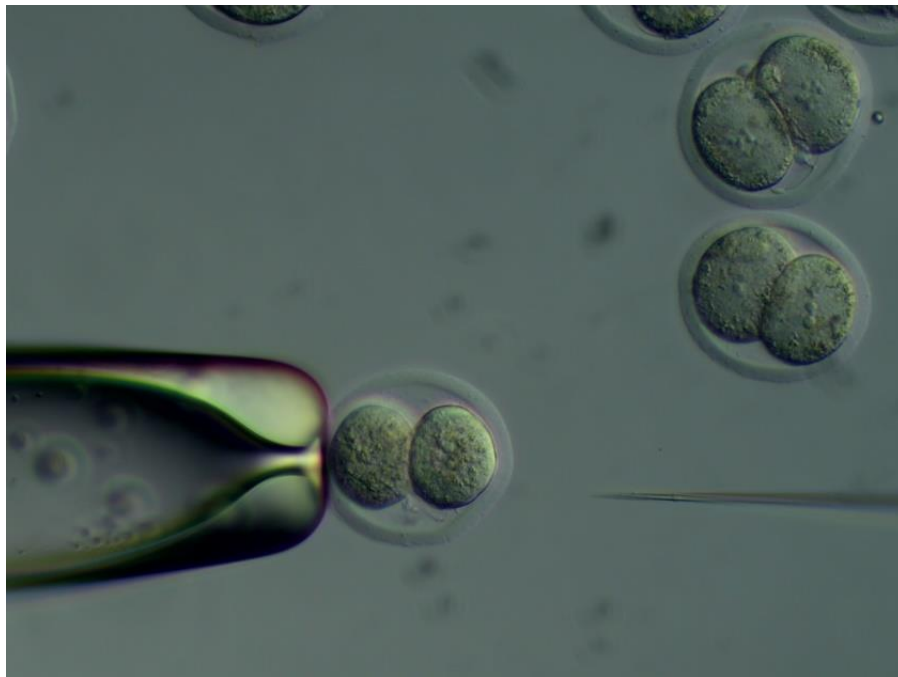
A mikroinjektálás (4. ábra) művelethez egy mikroszkóp és két robotkarral rendelkező mikromanipulációs rendszer szükséges. A két robotkar a hidraulikus, szájjal vezérelhető tartó pipettát és a szűrő pipettát irányítja (Liu et al., 2013). A mikroinjekció lényegében egy mikrosebészeti eljárás, mely sejtenként végezhető. Mikroinjektor segítségével a genetikai anyag a sejtekbe jut üvegtűn (mikrokapillaris pipetta) keresztül. A struktúra részét képezi egy precíziós pozicionáló eszköz (mikromanipulátor) is, amely a mikropipetta mozgását vezérli. A pronukleáris injektálás igen hatékony, magas szintű génexpressziót eredményezhet, azonban munkaigényes, ugyanis egyszerre csak egy sejtet lehet injektálni, és számos esetben több ismétlésre lehet szükség a beépülési gyakoriságtól függően. Ez néhány száz sejt manipulálását teszi lehetővé. A citoplazmatikus injektálás egyszerűbb eljárás, de kevésbé hatékony az enzimatis (nukleáz) citoplazma degradáció miatt. A mikroinjekció hatásos módszer rekombináns sejtvonalak előállítására. Ilyen például a zöld fluoreszcens fehérje (GFP) mint riportergén átkerülése különböző sejtvonalakba (Maloy és Hughes, 2013).



4. ábra Mikroinjektálás sematikus rajz (Forrás: Chaible et al., 2013, szerkesztve)

A mikroinjektáláshoz általában egy kb. 100x-os nagyítású inverz mikroszkópot használnak. Az injektálás mikroszkóp alatt történik mikromanipulátor segítségével. Az embrió szerkezetének láthatóvá tételéhez differenciális interferencia kontraszt (DIC) optikára van

szükség. Az embriók M2 médiumban olaj alatt vannak tárgylemezre helyezve, így csökkenthető a folyadék párolgása. A mikroszkóphoz csatlakozó két mikromanipulátor két oldalról rögzíti a kapillaris tűket, melyek közül az ún. holder kapillaris helyben tartja az embriókat, a szűrő kapillaris (általában 0,5 és 5 μm közötti átmérőjű) pedig a génkonstrukció felvételére képes, kihasználva annak kapillaris hatását. Ez a kis átmérőjű üveg kapillaris teszi lehetővé a DNS sejtbe való bejuttatását. Az szűrő kapillarist azonos fókuszszíkba kell állítani a pronukleusszal, majd a tartó pipettával történő embrió felvétel és rögzítés után a szűrő kapillaris behatol a zona pellucidán és sejtmembránon keresztül a pronukleuszba vagy sejtmagba és befecskendezi a vektort. Az apai pronukleusz nagyobb, mint az anyai, a sejt periferiáján helyezkedik el, a második poláris testhez közelebb, általában ez kerül injektálásra. A nyomás szabályozását injektor végzi. Nagyságrendileg 1-5 pL konstrukció jut egy-egy sejtbe. A sikeres bejutást a pronukleusz megduzzadása jelzi, de kerülni kell az elősejtmag hártájának felhasadását. Az erős fizikai hatásnak kitett embriók egy része visszafordíthatatlanul károsodik és a lízis következtében elpusztul.



5. ábra Kétsejtes embrió mikroinjektálása (Forrás: saját fotó)

A túlélő embriók beültetésre kerülnek az injektálást követően, vagy HTF táptalajban inkubáljuk éjszakára, 37 °C-on, 5% CO₂ mellett. Ezeknek az embrióknak egy része az éjszakai inkubációt követően kétsejtes stádiumig osztódik, néhány azonban megáll egysejtes állapotban, vagy rendellenes fejlődést, fragmentációt (sejttörmelék-képződést) mutat. Az embriók

osztódásának detektálása bizonyosságot adhat életképességükről, ezért a másnapra osztódott és transzferált embriók születési rátája magasabb.

A szabályosan osztódott embriókat álvemhes recipiens béranyák petevezetékébe ültetik, ahol életképes egyedekké fejlődhetnek. A megszülető utódok egy része hordozza a beépült DNS szakaszt, vagyis a transzgént, a transzgén jelenlétének detektálása genotipizálással történik. A beépülés hatékonysága konstrukciónként eltérő lehet (Liu et al, 2013).

2.7. Embrió beültetés

Az embrióbeültetés, más néven embriótranszfer (ET), elterjedt eljárás a rederiválási protokollokhoz, a fagyasztott embriókból vagy spermából történő vonal felélesztéshez és a génmanipulált állatok előállításához. Az eljárás során egémbriókat visznek át álvemhes nőstények petevezetékébe, hogy a transzfert követően ezek a recipiens anyák (6. ábra) hordják ki az utódokat (Lamas et al., 2020).



6. ábra B6FVB/AntF1 recipiens anya kölykeivel (Forrás: saját fotó)

Csak álvemhes egyedekkel érhetjük el, hogy a vemhesség sikeresen fennmaradjon és az beültetett embriók megfelelő fejlődésnek induljanak, mivel ezek a nőstények hormonálisan és fiziológiailag kompetens befogadóként szolgálnak a megtermékenyített petesejtek számára

(Murphy és Carter, 1993). Az álvemhesség egy neuroendokrin reflex, amely külső ingerekre (vaginocervikális stimuláció) történő reakció által megváltoztatja a reprodukív fiziológiát, hasonlóan a korai terhességhez (Yang et al., 2009). Azonban a hormonálisan kiváltott ivarzás-szinkronizálás hátrányosan befolyásolhatja a beültetett embriók implantációját, ezért hormonkezelést nem alkalmazunk. Ehelyett a megfelelő ivari ciklusban lévő nőtények kiválasztására vazektomizált hímekeket használunk. A vazektómia során az ondóvezeték sebészeti úton megszakítják, így a spermiumok nem juthatnak a női nemi utakba. A here továbbra is megőrzi spermiumtermelő képességét, de a mellékherékben a spermiumok elhalnak és felszívódnak. A műtéten átesett hímekek megőrzik szexuális potenciájukat, és párzás után kopulációs dugót hagynak, de az ondóváladék spermiumot nem tartalmaz, ezért a hímekek nem képesek a nőtényeket megtermékenyíteni. A műtétet fiatal, ivarérett, egészséges hímekeken kell elvégezni. A beavatkozást követően az egereket ketrecekben egyedileg elhelyezve 3 hét regenerációs idő után lehet a nőtényekkel pároztatni. Bármely magas szexuális potenciájú törzs használható ilyen célra. A Swiss hímekek jól teljesítenek, ezért általában FVB/AntJ háttérű F1 hibridek használatosak erre a célra. Egyes laboratóriumok genetikailag steril hímekeket használnak (Murphy és Carter, 1993). Ezekkel a hímekekkel pároztatott nőtények közül csak az proösztuszban levők mutatnak hajlandóságot, melyet a párzást követő napon nyomon követhetünk a nőtények vaginájában megszilárduló plug jelenlétével (Hasegawa et al., 2017). Ellentétben a patkányok álvemhességének kiváltásával, amely egyszerűen indukálható a méhnyak mesterséges mechanikai ingerlésével, az egereknél ehhez a hím ejakulációja szükséges (Yang et al., 2009).

2.8. Kórokozómentesítés embriótranszferrel (rederiválás)

Az OGR-ben három különböző higiéniai státuszú szintet alakítottak ki. Ezek a konvencionális tér, MD (Minimal Disease) és SPF (Specified Pathogen Free) tér. A konvencionális térben átlagos higiénés szabályok kerülnek betartásra, míg az SPF részben magas higiénés státuszú transzgénikus állatok vannak.

A publikációk eredményeinek reprodukálhatósága érdekében meghatározó jelentőségű a genetikailag azonos egértörzsek használatán kívül az a jelenség, hogy az állatok bizonyos betegségektől mentesek legyenek. Ugyanis a különböző kórokok, paraziták, betegségek kihatnak az állatok viselkedésére, tehát stresszfaktorok lehetnek, vagy a biológiai funkcióik nem megfelelő működését idézhetik elő, ami nagymértékben eltorzíthatja egy kísérlet

kimenetelét. Tehát a laboratóriumi állatok mikrobiológiai minősége igen fontos tényező a kísérleti létesítményekben a kutatási adatok validitása érdekében. Ezért fontos, hogy az állatok egészségi állapotának nyomon követésére olyan programot hozzanak létre, amely egyben a minőségbiztosítási rendszer szerves részét képezi. Ennek érdekében a génmódosított állatokat előállító SPF állatháznak meghatározott fertőző betegségektől mentesnek kell lennie. Ez nem a teljes csíramentességet (gnotobiota) jelenti, ugyanis a szervezetben többek között az immunrendszer és emésztés megfelelő működéséhez szükség van különböző mikroorganizmusok jelenlétére, de kizárhatjuk azoknak a patogén mikrobáknak és parazitáknak az előfordulását, amelyek az állatok megbetegedését idézik elő. Ezen állapot fenntartásához útmutatóként szolgál az Európai Laborállat Szövetség (FELASA) ajánlása, hogy mely kórokozóktól és betegségektől kell mentesnek lenni az állományoknak (Mähler et al., 2014). A státusz ellenőrzéséhez negyedévenkénti vizsgálatok szükségesek.

Amennyiben egy állomány ezektől a betegségektől nem mentes, indokolt a patogének átvitelének elkerülése érdekében mentesítést végezni. Ilyenkor fertőzött anyáktól fertőzésmentes utódokat kapunk. A folyamat neve rederiválás, kórokozó mentesítés. Ennek egyik módszere a hysterectomia, és a császármetszés, ami közvetlenül ellés előtt történik, ugyanakkor ezek invazív és kevésbé biztonságos módszerek. Alternatív eljárás az embriótranszfer, amikor vagy hagyományos megtermékenyítést követően zigóta stádiumú embriókat preparálnak, vagy a fertőzöttnek minősülő vonal hímjeit felhasználva *in vitro* fertilizációt (IVF) végeznek, majd az embriókat tiszta, álvemhes recipiens nőtényekbe ültetik be (Suzuki et al., 1996).

Ezt megelőzően a donorok egy hormonális kezeléssel esnek túl, melynek következtében szuperovulációt váltunk ki a nőtényekben, ezzel növelve az embriószámot, és a rederiválás hatékonyságát. A recipiens nőtények vazektomizált hímekkel való párosítása nélkülözhetetlen az embriótranszfer végrehajtásához, ugyanis ahhoz, hogy szervezetük képes legyen befogadni a beültetendő embriókat, a párzás által álvemhességet kell kialakítanunk bennük. A tiszta recipiens nőtényekbe beültetett embriókból megszületett kölykök egyedileg szellőztetett ketrecekbe kerülnek. A születés után 3 héttel a dajka anyából levett vérmintából végzett szerológiai vizsgálat negatív eredménye esetén a kórokozómentes egyedek átkerülnek a törzstenyészetbe továbbtartásra és szaporításra. Ezáltal SPF higiéniai státuszban nevelhető tovább az egér vonal.

3. Alkalmazott anyagok és módszerek

3.1. A munkához felhasznált génmódosított és genetikailag nem módosított egértörzsek

Az embriológiai és asszisztált reprodukciós munkálatok során többféle egértörzset szükséges használni attól függően, hogy milyen célra hasznosítjuk őket. A törzsek genetikailag különböznek egymástól, ezért tulajdonságaik eltérőek. Ahhoz, hogy a folyamatok sikeresen végbemehessenek, az adott beavatkozáshoz optimális törzset kell kiválasztanunk. Az egyes törzseket az alapján választjuk meg, hogy az egyes procedúrák mit kívánnak meg. Például fontos, hogy az embriókat olyan recipiens béranyákba ültessük, amelyek azonfelül, hogy képesek nagyobb számú embrió kihordására, jó anyák, stabilan fel tudják nevelni a kölyköket. A következőekben az embriológiában használatos törzseket és vonalakat mutatom be felhasználási területük és jellemvonásaik alapján.

3.1.1. C57BL/6

A legszélesebb körben alkalmazott beltenyésztett egértörzs, számos vonal genetikai hátterét adja, ugyanis általános többcélú modell, számos kísérlet építhető rá, a legtöbb mutáció megnyilvánul benne. A legtöbb rederiválható vonalhoz felhasználható, illetve ideális transzgen modellek kidolgozásához. A törzs két különböző vonalával dolgoztunk, melyek elnevezés szerint: C57BL/6J és C57BL/6NTac. A C57/BL egerek beltenyésztett törzsét 1921-ben az Egyesült Államokban C.C. Little hozta létre, majd a Jackson Laboratóriumba -melynek alapító tagja volt- kerültek az állatok. A legnépszerűbb altörzs a "6-os" volt, ezért ez maradt fent az altörzsek közül. A C57/BL6J nevében a „J” betű a Jackson Laboratórium nevére utaló kód, amely az eredeti törzset jelöli. Később más intézetekben, egymástól elszigetelten elkezdtek tenyészteni a törzset. Ezekből a kolóniákból további altörzsek fejlődtek ki a genetikai variabilitás következtében. A C57BL/6N altörzset a C57/BL6J-ből hozták létre 1951-ben az Országos Egészségügyi Intézetben (National Institutes of Health, röviden NIH) innen ered az „N” jelölés. Később az NIH altörzset több intézetbe eljuttatták. Az altörzs egy kolóniáját a Taconic Biosciences vállalat tartja fent, a „Tac” jelzés innen származik a C57BL/6NTac elnevezésben. A szétválasztott törzsek között jelentős eltérések vannak a genetikai sodródás miatt. Például a C57BL/6N egy retina-degenerációért felelős Crbrd8 allélt hordoz, míg a C57BL/6J állatokban az allél vad típusa található meg (Mattapallil et al., 2012). Az intézetben a legtöbb

idegrendszeri, viselkedésvizsgálati kísérlethez C57/BL6J háttérű egereket használnak a kutatók. Ezért a rederiválendő vonalak embriótranszferét az ilyen típusú donor nőstényektől nyert petesejtekkel végezzük, és ezeket különböző genetikailag módosított hímek spermájával termékenyítjük meg. A C57/BL6J zigóták azonban törekenyek, emiatt mikroinjektálásra alkalmatlanok, ennél fogva a génmódosításokat C57BL/6NTac embriókon végezzük.

3.1.2. FVB.129P2-Pde6b+ Tyrc-ch/AntJ (FVB/Ant)

Az FVB/N törzsbe tartozó egerek egy tirozináz génhiba következtében albínók (Tyrc/c), emellett retina-degenerációban (Pde6brd1/rd1) szenvednek, ami elválasztási korra vakságot okoz. Ez nyugtalan természetüket, szorongásukat eredményezi. A mutáció negatív hatásának kiküszöbölésére kitenyésztették az FVB/N látó változatát. Az FVB/Ant egerek a 129P2/OlaHsd vad típusú Pde6b allélra homozigóták, így nem szenvednek vakságban, amit a retina-degeneráció okoz. Ennek következtében olyan vizsgálatokban használhatóak, ahol FVB háttérű egereket használnak kontrollként, de szükség van az egerek látására, mint például a viselkedési vizsgálatokban. A Tyrc-ch allél homozigotizálásának eredményeként az egerek pigmentált, chinchilla színűek. Stresszhatásra előfordulhat a megszületett almok eltaposása és elfogyasztása, emiatt kevésbé alkalmas recipiens anyának. Azonban széles körben használt beltenyésztett törzs, mikroinjektáláshoz elsőrangú a megtermékenyített petesejtekben lévő nagyméretű, jól látható pronukleuszok és sejtmagok miatt. A donor nőstények sok esetben tőlük kerülnek ki. Nagy alomszám jellemzi (Errijgers et al., 2007).

3.1.3. B6BALB/cF1

C57BL/6J anyai és BALB/c apai vonalak keresztezéséből származó első generációs hibrid utódai. Ezek a hibridek genetikailag azonosnak tekinthetőek. A beültetésekhez használjuk őket recipiens anyaként jó utódnevelő képességeik és kannibalizmusra való alacsonyabb hajlamuk miatt, valamint vazektomizált hímek előállítására. Ebben az esetben a heterózishatás is érvényesül, a beltenyésztett törzsekkel ellentétben, melyek szaporodóképessége és aktivitása alacsonyabb. Ezenkívül további variációkban hozhatunk létre F1-es utódokat az apai partner megválasztásával. Az anyai partner mindegyik esetben C57BL/6J volt. Béranyaként a következő hibridek kerülnek még felhasználásra: B6FVB/AntF1, B6CBAF1.

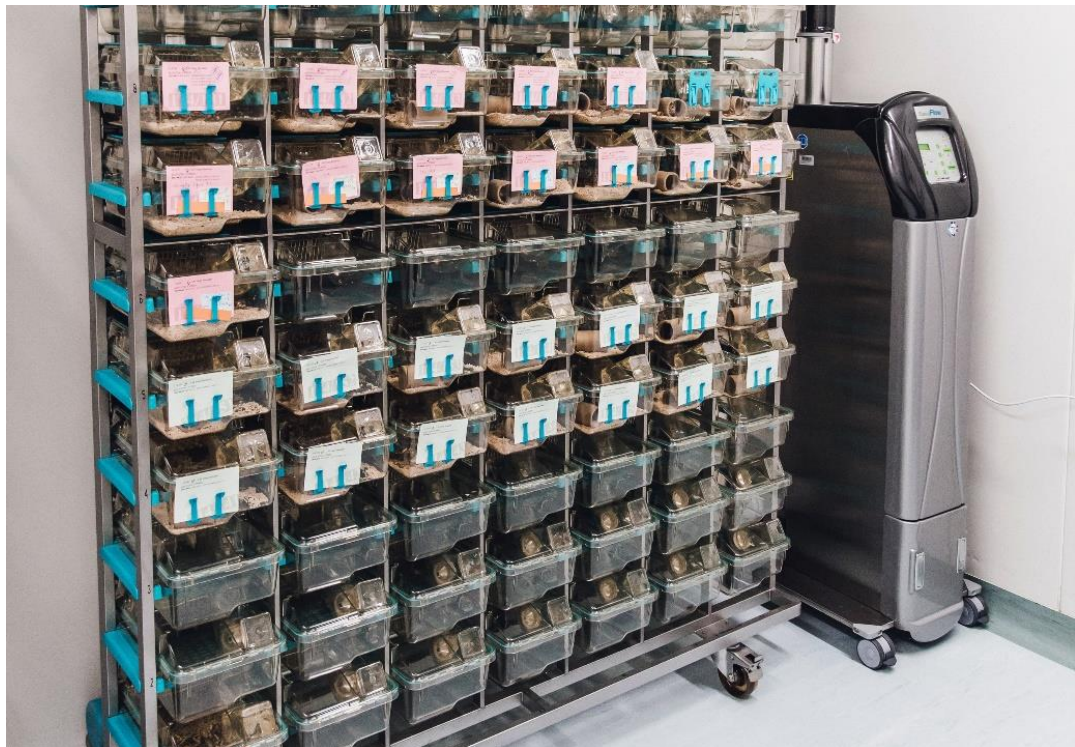
3.1.4. Génmódosított vonalak

Különböző genetikailag módosított állatok, melyek vonalak felélesztéséhez, rederiváláshoz, kolóniaalapításhoz és fenntartáshoz szükségesek.

3.2. Az állattartás körülményei

A kísérletek és publikációk hitelességének megőrzéséhez nélkülözhetetlen a megfelelő mikrobiológiai minőségű egerek folyamatos előállítás. Ezt az SPF állatház biztosítja a kutatók számára a FELASA útmutatása alapján. Az előírások szerinti megfeleléshez és magas szintű higiéniai státusz fenntartásához néhány óvintézkedést be kellett vezetni az állatház működésében. A patogének bejutását több gát (ún. barrier) védi. A beléptetés zsilibrendszeren keresztül történik. Ehhez hozzátartozik dolgozói oldalról a korlátozott bejárás, fertőtlenítőszeres bemosakodás, légzuhany, aszeptikus védőruházat (szkafander, kesztyű, szájmazsk használata) és az otthoni állattartás korlátozása. Az állatok közvetlen védelmét ezenkívül az ultraszűrt ivóvíz, autoklávon keresztül bejuttatott steril táp, alomanyag, állattartási eszközök és felszerelések (ketrec, itató, stb.) biztosítják. A nem autoklávozható anyagok formalin kamrában történő sterilizálás után kerülnek be az SPF térbe. Az kórokozók kívülről való bejutásának megakadályozását ezenkívül a szellőzőkre felszerelt HEPA szűrők által csíra-mentessé szűrt levegő és a légnyomás szabályozása segíti elő. A légnyomás a szoba-kültér irányába csökken, tehát a térben enyhe túlnyomás uralkodik, mely megakadályozza a levegőben lévő kórokozók befelé áramlását. Az esetleges fertőzések kimutatására az állattartó szobákban állványonként elhelyezett „sentinel” állatokat használunk. BALB/c törzsből származó nőstények töltik be ezt a szerepet, melyek a kórokozókra rendkívül érzékenyek. A ketrecükbe a szoba összes állatának szennyezett alomanyagából, használt tápjából kerül egy kevés, hogy fertőzés esetén a leghamarabb mutassák a betegség jeleit. A kórokozómentesség folyamatos ellenőrzése bélsármintájuknak PCR alapú vizsgálatával történik, valamint negyedévente a sentinelek véréből és bélsarából vett minták teljeskörű laborvizsgálatával valósul meg. Az embriótranszferen átesett, mikroorganizmusokkal való fertőződés kockázatának nagyobb eséllyel kitett állatok és utódaik egyedileg szellőztetett ketrecrendszerben (7. ábra) vannak elhelyezve az állatház egészétől elzárt szobában, csak a recipiens nőstények negatív szerológiai vizsgálati eredménye után kerülhetnek ki az SPF tér tenyésztő szobáiba. A tenyésztetek is zárt ketrecekben kapnak helyet. Az állatimport megbízható vendoroktól származik. Karantén és higiéniai státuszvizsgálat után kerülnek be az állatházba, illetve génmódosított állatok csak

embriótranszferes kórokozómentesítés útján. A donor és vazektomizált hímek egyesével vannak tartva nyitott ketrecekben.



7. ábra Szellőztetett ketrecrendszer (Forrás: KOKI)

A tér légmentesen zárt, klimatizált. Állandó 22-24°C-os hőmérséklet, 40-60%-os relatív páratartalom jellemző. A megvilágítás fényintenzitása 1000 lux mennyezetmagasságban, a fényciklus 12-12 óra.

3.3. Alkalmazott anyagok, oldatok, hormonok

M2: MERCK EmbryoMax® folyékony M2 médium fenol-vörössel, USA

KSOM: CARD KSOM, Cosmo Bio Co., Ltd., Japán

HTF: HTF Cosmo Bio Co., Ltd., Japán

GSH: 0,0307 g L-Glutathione reduced (Sigma-Aldrich) 1 ml HTF-ben feloldva, majd ezután 0,22 µm pórusméretű Millex membránon átszűrve

Ásványi olaj: FertiCult™ Mineral Oil (paraffn olaj), FertiPro, Belgium

PMSG: Prospec PMSG 5000IU, fiziológiás sóoldattal 50IU/ml-re hígítva

hCG: Prospec HCG Protein 5 mg, fiziológias sóoldattal 50IU/ml-re hígítva

CARD FERTIUP Preincubation Medium (PM)

Avertin: törzsoldat: 10 g Sigma-Aldrich 2,2,2-Tribromoethanol feloldva 10 ml Sigma-Aldrich 2-Methyl-2-butanol-ban; hígítás: 400 ml törzsoldatot fiziológias sóoldattal felönteni 20 ml-re

Meloxicam tableta: Bio-Serv Mouse MD's™ – Meloxicam (0,125 mg/tabletta)

3.4. Alkalmazott protokollok

3.4.1. Hormonkezelés

A 2022. januárja és októbere között alkalmazott protokollt követve az *in vitro* fertilizációhoz felhasznált donor nőtények szuperovuláltatása 5NE intraperitoneális PMSG injekcióval történt 17:00-kor. Az első injekció után 49 órával, 18:00-kor 5 NE hCG hormonkezelést kaptak. A folyamathoz 4-6 hetes állatokat használtunk. Ez a kor a C57/BL6 törzsnél fontos, ugyanis érzékenységük fiatalabb korban magasabb, az idősebb állatok kevésbé reagálnak jól a hormonkezelésre. 2022. októberétől Lamas által alkalmazott módszer (Lamas et al., 2021) alapján az oltások időpontja módosult, melyben a PMSG és hCG injekció is 15:00 órakor került beadásra. A protokoll a többi procedúrában egyezést mutatott a korábbival. Az IVF időpontját egyik módszernél sem változtattuk meg, csupán a hormonkezelés idejét.

Hagyományos pároztatásnál a PMSG beadása 14 órakor, majd ezt követően a hCG injektálása 47 óra elteltével, 13 órakor történt. A nőtények életkora ebben az esetben magasabb volt (8-10 hetesek), ugyanis a természetes pároztatáshoz tenyészetnek kellett lenniük.

3.4.2. Hagyományos pároztatás

Hagyományos pároztatás során a nőtényeket előzetesen szuperovuláltattuk a magasabb oocya-szám érdekében, majd egyesével kerültek donor hímekhez a hCG beadását követően, hogy bekövetkezzen a kopuláció. Minden esetben a nőtények kerültek a hímek ketrecébe egy teljes éjszakára. Az ovuláció körülbelül 12 órával a hCG injekció beadása után következik be, ekkor a petesejtek megtermékenyíthetők. A nőtények bár azonosnak tekinthető ivari ciklusban voltak, de a hímek szexuális aktivitása változó lehetett, ezért nem minden nőtény pározott. A

módszer alacsonyabb hatékonysága miatt a donor nőstények száma körülbelül kétszerese, míg a donor hímeké kilenc-tizennyolcszorosa is lehet az *in vitro* fertilizációval összehasonlítva. Túlnyomórészt FVB/Ant hímekeket használtunk fel donorként, emellett a létrehozandó új vonalak genetikai hátterének függvényében más törzsekkel is dolgoztunk.

3.4.3. *In vitro* fertilizáció

A Naomi Nakagata-féle (Department of Reproductive Engineering, Center for Animal Resources and Development - Kumamoto Egyetem, Japán) (Takeo és Nakagata, 2018) CARD-módszernek és a Jackson Laboratórium protokolljának (Low et al., 2016) kombinációjával végeztük az *in vitro* fertilizációt.

A sperma gyűjtéséhez 35x10mm-es petri-csészében egymás alatt egy 100 µl-es és egy 200 µl-es PM cseppet készítettünk, amit paraffinolajjal (~3ml) lefedtünk. Az oocyta gyűjtéshez 3-4 állatonként 1db megtermékenyítő cseppet készítettünk 35x10mm-es petri-csészében, amelybe 90 µl-es HTF médiumot 0,9 µl 1mM-os GSH koncentrációval tettünk olaj alá. A sperma és petesejtek inkubációjához szükséges médiumokat az IVF előtt fél órával az inkubátorba helyeztük a kívánt gázkoncentráció eléréséhez. Az embriók mosásához (8. ábra) 60x15mm-es petri-csészében 3 db 100 µl-es és 1db 200 µl-es HTF cseppet készítettünk olaj (~5ml) alá helyezve.



8. ábra Embriók mosása SPF öltözékben (Forrás: KOKI)

Többnyire C57BL/6NTac, C57BL/6J, FVB/AntJ vonalak kerültek felhasználásra petesejt preparáláshoz a kísérletek által megkívánt genetikai háttér alapján. A donor hímek főként különböző transzgenikus állatok voltak a céltól függően. Vonalanként 1-2 hímet használtunk fel. A terminálást cervikális diszlokációval végeztük. Az állatok alhasi tájékát 70%-os etanollal lefertőtlenítettük. A here fölötti bőrön bemetszést ejtettünk, majd a hasfalat és hashártyát átvágva csipesszel a zsírpárnákat megcsípve kiemeltük a mellékheréket és elvágtuk az ondóvezetéseket. A mellékheréjüket és ondóvezetékük egy szakaszát papírvattán leittattuk, hogy minél kevésbé legyenek vérrel szennyezettek, majd ezt követően a 200 µl-es PM cseppbe helyeztük. Az epididymiseket és vezetéseket mikrosebészeti ollóval összevagdostuk, hogy ezzel a spermiumok kiáramlását biztosítsuk. A szöveteket a médiumból eltávolítottuk. A sperma kapacitációja itt történt 35 percig. A spermát 10 perc múlva kihígítottuk a 100 µl-es cseppbe, ahová a nagyobb csepp szélén lévő legmotilisabb spermiumokból pipettáztunk át ~10 µl-t. Mikroszkóp alatt vizsgáltuk a sperma minőségét. Megfigyeléseink alapján, FVB háttérű hímek használatakor a spermiumok PM oldatba kerülve hamar összezsugorodtak, ami a megtermékenyítés határfokát negatívan befolyásolta. Az ilyen spermával termékenyített petesejtek alacsony termékenyülési rátát mutattak. Ezt elkerülve, a protokolltól eltérve korábban végeztük el a kihígítást ezekben az esetekben. A sperma minősége vonalanként és egyedenként is eltért. A spermiumszám és motilitás meghatározó tényező az IVF sikerességében. Ezt követően az oocyta gyűjtéshez 9-18 db 4-6 hetes donor nőtényt termináltunk a hímekhez hasonló módon. A hasukon ejtett bemetszésen keresztül szedtük ki a petefészkeket a méh egy szakaszával együtt. A preparálás után leittattuk a szöveteket és a megtermékenyítő cseppben a HTF-et körülvevő olajba helyeztük. Túvel megszűrve az ampullát kimostuk az ovulált petesejteket, majd a HTF cseppekbe húztuk a cumulus felhőkbe ágyazott oocytákat. Az inkubációs idők letelte után a petesejteket tartalmazó cseppekhez ~10 µl spermát adtunk, és további 3-4 órán keresztül itt zajlott az inkubáció (<https://medschool.vanderbilt.edu/vcmr/recovery-protocols/ivf-card-protocol/>).

3.4.4. Rederiválás

Szintén a CARD féle módszerrel végeztük a rederiváláshoz szükséges IVF-et, azzal a különbséggel, hogy a fertőzöttnek minősülő tenyésztett (legalább 9-12 hetes) hím egyedek a Befogadó állatházban (konvencionális tér) voltak elhelyezve, melyekből csak a kipreparált epididymisek és ondóvezetők kerültek fel az SPF-tér melletti laborba. Az ezekből kinyert spermával termékenyítettük a kórokozóktól mentes donor nőtényekből származó petesejteket.

Az embriók maceráció (mikroinjektálás) nélkül kerültek paraffinolaj alatt HTF vagy KSOM oldatba, majd másnap, kétsejtes állapotban lettek beültetve az SPF-térben élő álvemhes recipiens nőstényekbe.

3.4.5. Álvemhes nőstények létrehozása

Erre a célra a 3 különböző hibrid vonalat használtunk: B6BALB/cF1, B6FVB/AntF1, B6CBAF1. Hormonkezelés után a szintén hibrid vazektomizált hímekekkel raktuk össze őket. A nőstények különböző típusait időről időre váltogattuk a hímeknél a magasabb aktivitás érdekében. Másnap reggel a plugok alapján válogattuk ki az ültetendő egyedeket.

3.4.6. Beültetés

Az embriók beültetése a megtermékenyítést követő első, vagy második napon történt. Ilyenkor egy-, illetve kétsejtes állapotú embriókkal dolgoztunk. Az embrió beültetéséhez előkészítettük a kijelölt állatokat, és műtéti steril eszközöket. A transzfert megelőző napon a vazektomizált hímekekkel pározott nőstények közül kiválogattuk a pluggal rendelkező egyedeket, melyeket a műtéthez használtunk. A recipiens nőstényeket intraperitoneális Avertinnel (tribróm-etanol) elaltattuk. Eközben az ültető kapillárisokba rendeztük az embriókat. A kapillárisokba kis térfogatú médiumot szívtunk fel, ezután légbuborékot, majd újra médiumot, ezt követően az embriókat, majd a végét buborékkal zártuk. A beültetést szájpipetta segítségével végeztük. Az egeret a hasi oldalára fektetve a gerincoszlop mentén 4-6 mm hosszú bemetszést ejtettünk, majd átvágtuk a bőrt és kötőszövetet. Apró rést vágva kiemeltük a hasüregből a petefészket, petevezetőket és a méhszarv végét a zsírszövetnél fogva, majd ún. bulldog csipesszel stabil pozícióba rögzítettük. A petevezeték infundibulumot követő szakaszán 27G méretű tűvel szúrászt ejtettünk, majd a szúrási csatornán bevezettük az ültető kapillárist. A méh irányának megfelelően az ampullába óvatosan bejuttattuk az embriókat. A petefészkeket visszahelyeztük a hasüregbe. A sebet Michel sebkapoccsal zártuk. Az alvó recipienseket ébredésig a testhőmérséklet kontrollálására fűtőlapon tartottuk. Posztoperatív fájdalomcsillapításként Meloxicam fájdalom- és gyulladáscsökkentő tablettát adtunk az állatoknak. Másnap ellenőriztük egészségi állapotukat.

A beültetést követően az anyák szellőztetett ketrecben karanténba kerültek, ahol az utódok elválasztásáig tartózkodtak. A higiéniai státuszvizsgálat ellenőrzése után az újonnan létrejött transzgenikus állatok kolónia alapítóként kerültek át tenyészetekbe.

4. Eredmények és értékelésük

4.1. IVF-hez használt donor nőtény egerek szuperovuláltatása

A hormonkezelés optimális időpontjának és dózisának beállítása következtében megfigyelt embriószám növekedés:

A vizsgálatok megkezdésekor azt tapasztaltuk, hogy az IVF-hez használt nőtényektől nyert megtermékenyíthető oocyták száma átlagosan jelentősen alacsonyabb az elvárható mennyiséghez képest. Ezért az addig használt, a Jackson Laboratory-nál beállított módszerhez képest kipróbáltuk a Lamas-féle időzítést és emelt PMSG dózist. 2022 októberében tértünk át az új módszerre, ezért a vizsgálatokban a 2022. január és szeptember közötti, illetve 2022. október és 2023. szeptember közötti időszakot vetettük össze. Összehasonlítva a korábban használttal lényeges különbségeket véltünk felfedezni a szuperovuláció utáni oocyta-számban. Az új módszerrel nagyobb mennyiséget értünk el a korábbi értékekhez képest. Az *in vitro* fertilizációs eseményeknél nem került ezelőtt dokumentálásra a nőtényekből kinyert összes ovulált petesejt-szám, mert nem volt számunkra releváns adat, ugyanis csak a megtermékenyített petesejteket használtuk fel, így ezeket az adatokat tudtam alapul venni.

975 donor nőtényt vetettünk össze másik 874 egyeddel, ahol az első csoport 975 egyede 17 órakor lett hormonkezelve 5 NE PMSG injekcióval, majd az ezt követő második napon 18 órakor 5 NE hCG injekcióval. A másik csoport 874 nőténye 15 órakor kapott 7,5 NE PMSG és 5 NE hCG injekciót is 48 óra eltéréssel. Az első csoporttól összesen 9637 db megtermékenyített petesejtet kaptunk, ami átlagosan 10 körüli zigótát jelent állatonként. A 15 órakor, emelt PMSG hormonnal szuperovuláltatott nőténytől összesen 20878 zigótát tudunk kinyerni, amely pedig megközelítőleg 24 db nőtényenként. Az eredményeket az *1. táblázat* szemlélteti.

1. táblázat Hormonkezelés hatása a petesejtszámra (Forrás: saját munka)

Hormonkezelés ideje	IVF események száma	Nőtények száma	Megtermékenyített petesejtek száma	Egy állatra jutó átlagos petesejtszám	
5 NE PMSG 17:00, 5 NE hCG 18:00	56	975	9637	9,9	100%
7,5 NE PMSG 15:00, 5 NE hCG 15:00	88	874	20878	23,9	241%

A megtermékenyített oocyták száma eseményenként eltérő volt. Ebből adódnak a nagy szórás értékek. Az átlag értékek alapján elmondható, hogy különbség figyelhető meg az egyes genetikai hátterek közötti petesejt megtermékenyülés kapcsán, valamint az élő állatból származó friss spermával és fagyasztott spermával történő termékenyítési arányok között (2. táblázat).

2. táblázat Genetikai hátterek között megfigyelhető különbségek a megtermékenyített petesejtszám tekintetében (Forrás: saját munka)

Nőstény (genetikai háttér)	Események száma	Megtermékenyített petesejt/nőstény (átlag)	Szórás értéke
5 NE PMSG: 17:00 – 5 NE hCG: 18:00			
C57Bl/6J (fagyasztott sperma)	1	8,9	-
C57Bl/6J (friss sperma)	11	10,2	5,3
C57Bl/6NTac	59	9,9	4,2
FVB/AntJ	6	12,9	4,2
Génmódosított	8	6,8	8,2
7,5 NE PMSG: 15:00 – 5 NE hCG: 15:00			
C57Bl/6J (fagyasztott sperma)	8	14,4	5
C57Bl/6J (friss sperma)	8	25,7	12,9
C57Bl/6NTac	33	26,5	33
FVB/AntJ	6	29,8	10,7
Génmódosított	33	24,7	9,5

A C57Bl/6J háttérű nőstények esetében a fagyasztott spermával termékenyített petesejtek lényegesen rosszabbul termékenyültek a friss spermával szemben. A többi háttérnél nem alkalmaztunk spermafelolvasztást az IVF-hez, ezzel a módszerrel csak a rederivált vonalak készültek, melyek genetikai háttere minden esetben C57Bl/6J volt. Ugyanakkor az új módszer kipróbálása petesejtszám növekedést eredményezett. A zigóták számában befolyásoló tényező lehetett például, hogy a donor állatok melyik törzshöz vagy vonalhoz tartoznak, a mutációk jellege, hogy ez kihatással van-e a szaporodási mutatókra, az állatok kora, szuperovulációra adott válaszreakció, a hímek spermájának minősége, az oldatok minősége.

A PMSG dózisának eltérő adagolásával a korábban beadott 5 NE/állat mennyiségű PMSG hormont 7,5 NE-re emeltük, majd figyeltük a kezelésre adott válaszreakciót és az oocyták számában történő változást. A PMSG dózist 1,5-szeresére növelve a szuperovuláció nagyobb hatékonyságot mutatott, ami szintén hozzájárulhatott az egyedenkénti életképes oocyta mennyiségének növekedéséhez. FVB/AntJ háttéren összehasonlító vizsgálatot végeztünk, hogy milyen hatással van a petesejt termelésre az eltérő időben történő azonos

PMSG mennyiség beadás (3. táblázat), valamint az azonos időben történő eltérő PMSG mennyiség, de önmagukban ezek nem okoztak szignifikáns különbséget.

3. táblázat Hormonkezelés hatása az embriószáma (Forrás: saját munka)

Hormonezelés időpontja	Genetikai háttér	Nőstények száma	Embriósám	Embrióelőállítás módszere
PMSG: 17:00, hCG: 18:00	FVB/AntJ	5	167	IVF
PMSG: 15:00, hCG: 15:00	FVB/AntJ	5	187	IVF

A megfigyelések alapján a két módosítás együttes hatására számottevő mértékben megemelkedett az ampullából kimosható oocyták száma. Ezek a változások magával hozták a donor nőstények számának csökkentési lehetőségét (3R reduction), ugyanis kevesebb állatból tudunk azonos, illetve nagyobb számú petesejtet előállítani. Az ezelőtt egy eseményhez felhasznált körülbelül 18 db donor nőstény számát 9-12 állatra tudtuk csökkenteni.

4.2. Beültetés

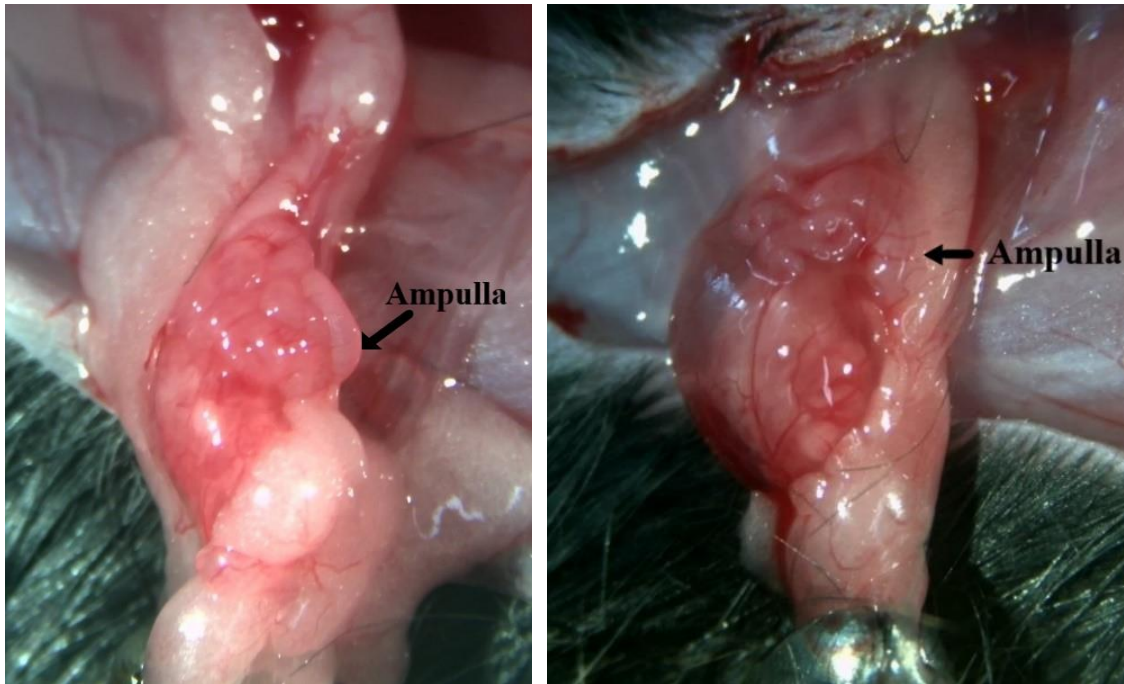
Vazektomizált hímek nemi működésének figyelemmel kísérése, a plugok alapján álvemhességet mutató nőstények szelektálása:

A recipiens nőstényeket vazektomizált hímekhez raktuk ki egyesével az embriótranszfert megelőző napon délután. A kopuláció leggyakrabban az éjszakai órákban következik be, emiatt általában nem kísérhető figyelemmel. Másnap délelőtt a párzásra utaló plugok alapján szétválogattuk a nőstényeket a párzást nem mutató egyedektől. A hímekhez heti egy-két alkalommal raktunk nőstényeket. A plugot adó, illetve nem adó egyedeket jelöléssel láttuk el. Az egymást követő nemi aktivitást többször nem mutató hímeket frissen vazektomizált hímekre cseréltük. A pluggal rendelkező nőstényeket ezután előkészítettük embriótranszferre és vizsgáltuk az álvemhességet mutató egyedeket a következőekben leírtak alapján.

Nőstény egerek petevezetékének ampulla szakaszának megfigyelése, és a beültetések sikere közötti összefüggések:

Mikroszkóp alatt figyeltük meg a nőstények petefészkeit és petevezetéküket. A petefészek állapota, petevezeték tágulata és ampulla átlátszóságának megfigyelése arra engedett

következtetni, hogy a pluggal rendelkező nőtények bizonyos százaléka nem mutatott álvemhességet. Ezek az állatok nem estek át embriótranszferen, csak a megfelelőnek ítélt egyedek. Csak azokba a recipiens nőtény egyedekbe ültettünk embriókat, amelyek az ampullájuk alapján receptívnek mutatkoztak (9.ábra).



9. ábra Plugos recipiens szűk (balra) és kitágult (jobbra) ampullával (Forrás: saját fotó)

A három különböző típusú recipiens nőtény petevezetéke mutatott némi eltérést, ami az eltérő genetikai háttér következménye. A petevezető ampulla szakaszának volt a legnagyobb jelentősége az implantáció tekintetében.

Azok a nőtények, melyek ampullája átlátszónak és tágának bizonyult, a párzásra álvemhességgel reagáltak, és vemhesedési arányuk magas volt. Az ampulla ezeknél az egyedeknél többszörös vastagságú volt a petevezető további szakaszainak átmérőjéhez képest. A plugos nőtényeknek kicsit több, mint harmada (39,9%) az ampullájuk alapján nem mutatott hormonális változást, közel kétharmada (60,1%) pedig álvemhességgel reagált a párzásra. A változást nem mutató nőtények a ciklus proösztusz szakaszában lehettek. Ampullájuk nem volt áttetsző, a petevezető petefészek felőli kezdeti szakasza vékony, gyakran fehér színű volt. Az eredményeket a 4. táblázaton mutatom be.

4. táblázat Álvemhességet mutató recipiens nőtények aránya 2023. július-szeptember időszakában (Forrás: saját munka)

2023					
Hónap	Recipiens nőtények száma	Ősztrusz fázisban lévő nőtények száma	Proősztrusz fázisban lévő nőtények száma	Álvemhes nőtények aránya	Álvemhességet mutató összes nőtény aránya átlagosan
Június	90	55	35	61,1	60,1
Július	44	25	19	56,8	
Augusztus	43	28	15	65,1	
Szeptember	104	61	43	58,7	

A recipiens nőtények plugok alapján való kiválasztása és az álvemhesség közötti összefüggések megfigyelésével, valami a petevezetők és ampulla átmérőjének, színének és átlátszóságának figyelemmel kísérésével, majd ez alapján történő szelektálással javultak az anyák vemhesedési arányai (melyet a 4.4 fejezet 5-6. táblázata szemléltet), és a megszületett utódok száma is növekedett (1-2. melléklet).

Az utódok számának növekedése az öt kategória közül háromnál volt megfigyelhető (rederivált vonalak 6,5%, felolvasztott spermával termékenyített petesejtekből származó embriók 17,9%, felolvasztás után beültetett embriók 11,9%) a mikroinjektált embrióknál ugyanez nem mondható el, mert ezeknél minimális csökkenéseket (1,7% hagyományos pároztatással előállított embriók és 1,9% in vitro fertilizációval előállított embriók) tapasztaltunk. A mikroinjektált embriók túlélési arányaira, ezzel beágyazódásukra és megszülésükre hatással lehettek az ebben az időszakban alkalmazott génkonstrukciók.

4.3. Recipiens nőtényekkel való bánásmód

Recipiens nőtények fájdalomcsillapítása:

A recipiens nőtények embriótranszfert követő fájdalomcsillapítására a bacon ízesítésű Meloxicam tablettát használtuk. A választásunk azért esett erre a fájdalomcsillapító módszerre, mert ezek az egerek számára ízletes tabletták ösztönzik az étvágyat a beavatkozás utáni időszakban, elősegítve a gyorsabb felépülést. Ideális fájdalommentes alternatívát jelentenek a stresszes műtét utáni injekciók helyett, helyet adva a 3R szabály *refinement* alapelvének, hogy a lehető legkisebb fájdalmat és szenvedést okozzunk az állatnak.

4.4. Vemhesülés, születés

Vemhesülés:

A 4.2. fejezetben említést tettem a recipiensek vemhesülési arányának növekedésére, amely a következőképpen alakult:

5. táblázat Recipiensek vemhesülési %-a 2022. január-szeptemberi időszakában
(Forrás: saját munka)

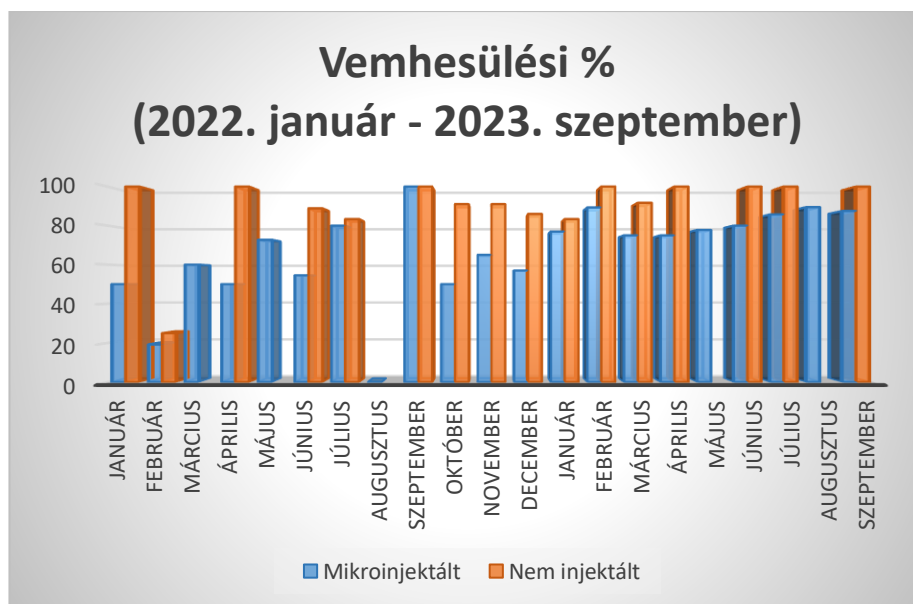
	2022 Vemhesülési %				
	PMI		PMI nélküli		
	IVF	hagyományos pároztatás	rederiválás	felolvasztott sperma	felolvasztott embrió
január	50	-	100	-	-
február	19	-	-	0	33
március	58	67	-	-	-
április	50	-	100	-	-
május	75	71	-	-	-
június	100	50	89	-	-
július	100	50	89	-	67
augusztus	nem osztódott	-	-	-	0
szeptember	100	100	100	100	-
átlag	69,1	67,6	95,6	50,0	33,3
szórás	29,8	20,5	6,1	70,7	33,3

6. táblázat Recipiensek vemhesülési %-a 2023. január-szeptemberi időszakában
(Forrás: saját munka)

	2023 Vemhesülési %				
	PMI		PMI nélküli		
	IVF	hagyományos pároztatás	rederiválás	felolvasztott sperma	felolvasztott embrió
január	76	100	100	-	0
február	89	100	100	-	-
március	73	100	88	100	-
április	76	67	-	-	100
május	76	83	-	-	-
június	80	-	100	100	-
július	86	-	-	100	-
augusztus	88	100	-	-	-
szeptember	88	-	100	-	-
átlag	81,3	91,7	97,6	100,0	50,0
szórás	6,4	13,9	5,4	0,0	70,7

A táblázatból leolvasható, hogy a tavalyi évhez képest minden kategóriában javultak az eredmények. Azok a recipiens nőstények, melyekbe in vitro fertilizációval előállított, mikroinjektált embriókat ültettünk, a vemhesülési arány 18%-kal, hagyományos pároztatásból származó mikroinjektált embriók esetében pedig 17,7%-kal nőtt. A kórokozómentesítést és vonalfelélesztést illetően a rederiválásból származó embriók esetében 2,1%-kal, a felolvasztott spermával termékenyített petesejtek esetében 32%-kal, míg embriófelolvasztásból történő beültetés során 16,7%-kal nőtt a recipiens anyák vemhesülési aránya a tavalyi évhez képest.

Az előző táblázatot tovább elemezve két kategóriára bontottuk, és vizsgáltuk a recipiensek vemhesülési arányát annak a tényezőnek a figyelembevételével is, hogy egyes embriók mikroinjektálás után kerültek beültetésre, míg mások anélkül rederiválás vagy vonalfelélesztés céljából, melyet külön grafikonon szemléltetnek (10.ábra). Az injektált embriók ennél a vizsgálatnál is rosszabb eredményeket adtak, ami szintén az injektálással összefüggésbe hozható lízis következménye.



10. ábra Recipiens nőstények vemhesülési %-a mikroinjektált és nem injektált embriók tekintetében (Forrás: saját munka)

Vemhesedés és születés közötti összefüggések:

Az embriótranszfert követően a beültetett embriók és a megszületett kölykök száma között próbáltunk összefüggéseket keresni. Korábban az anyánkénti alomszám nem volt

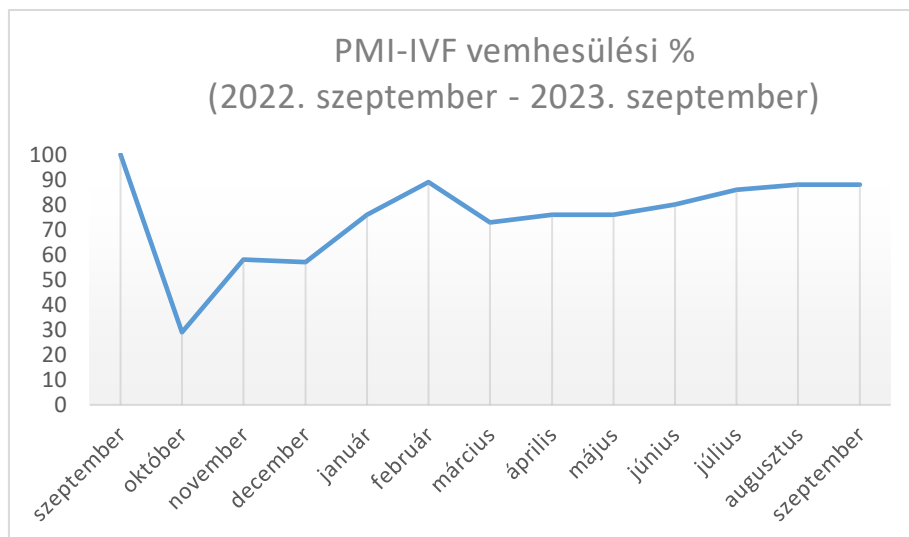
meghatározó jelentőségű, ezért csak az egy-egy rederiválási vagy mikroinjektálási eseményhez köthető összes nőtényből származó utód került dokumentálásra.

Az utóbbi időszakban az állatonként beültetett embriószám és utódszám elemzésével is próbáltunk kísérletet tenni a beültetés további optimalizálására. Bár viszonylag még kevés adat gyűlt össze, az a tendencia látszik érvényesülni, hogy a recipiensenként 20 beültetett embrió számának csökkentésével növekszik a megszületett utódszám (7. táblázat). Az megszületett utódok arányában jelentős különbség a mikroinjektált és anélkül beültetett embriók között volt, ami az injektálás során fellépő embriót érő fizikai károsodás következménye.

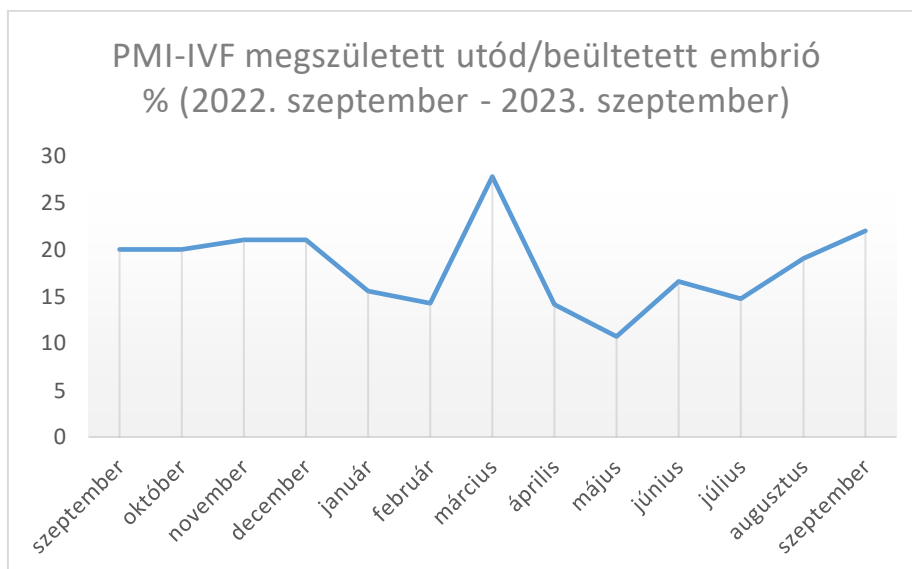
7. táblázat Beültetett embriószám és megszületett utódok összefüggései (Forrás: saját munka)

Embriószám	Megszületett utódok aránya (%)			
	Mikroinjektált	Esetek száma	Mikroinjektálás nélküli	Esetek száma
25	9,7	7	36	2
24	-	-	-	-
23	15,2	2	-	-
22	13,6	2	-	-
21	11,9	2	52,4	1
20	20,1	38	33,9	46
19	10,5	1	44,7	2
18	22,9	10	44,4	1
17	25,0	7	24,3	5
16	25,0	8	37,5	2
15	27,0	11	28,3	3
14	-	-	42,9	2
13	-	-	-	-
12	8,3	1	75	2
11	-	-	-	-
10	-	-	-	-
9	-	-	-	-
8	-	-	56,25	3

Figyelemmel kísértük a recipiens anyák beültetés utáni vemhesülési arányát is a 2022. szeptember és 2023. szeptember közötti időszakban, az *in vitro* fertilizációval előállított és mikroinjektált embriókra vonatkozóan is. Ezt követően a beültetett embriókból megszületett utódok arányával próbáltunk párhuzamot vonni. Az eredményeket a 11-12. ábrán mutatom be.



11. ábra Recipients nőstények vemhesülési %-a mikroinjektált, IVF-fel előállított embriókra vonatkoztatva (Forrás: saját munka)



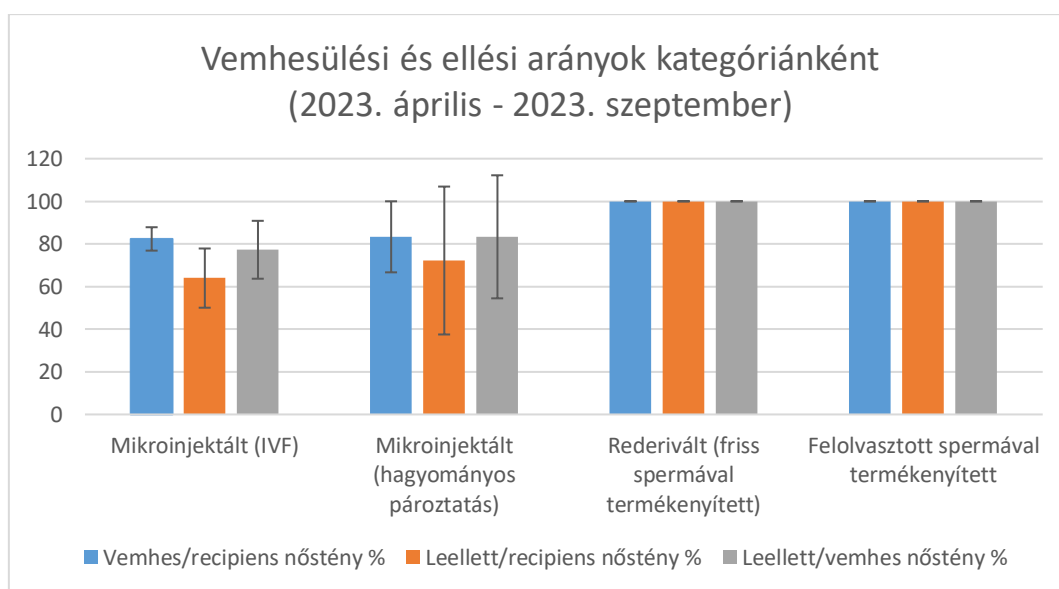
12. ábra IVF-fel előállított és mikroinjektált beültetett embriók megszületési aránya (Forrás: saját munka)

A grafikonról leolvasható 2022. októberében egy drasztikus vemhesedési csökkenés, amit valószínűleg egy új tenyésztő médium kipróbálása okozott. Ezt az időszakot megelőzően az embriók osztódása időnként alacsony értékeket mutatott, ezért másik gyártótól származó HTF-ben teszteltük és inkubáltuk az embriókat. Az embriók szabályos osztódása *in vitro* megfelelően működött, azonban *in vivo* valamiféle hiba következtében nem a várt eredményt hozta. A kis arányú vemhesedés ellenére a beágyazódott embriók születési aránya nem mutatott jelentős csökkenést az előző hónapokhoz képest. A teljes időszakot felölelően a megszületési arányok közötti nagy szórásértékek összefüggésben lehetnek az embriók különböző

génkonstrukciókkal történő módosításával és ezeknek eltérő mortalitásával. A márciusi kimagasló megszületési arányok a februári magas vemhesülési aránnyal is magyarázhatóak.

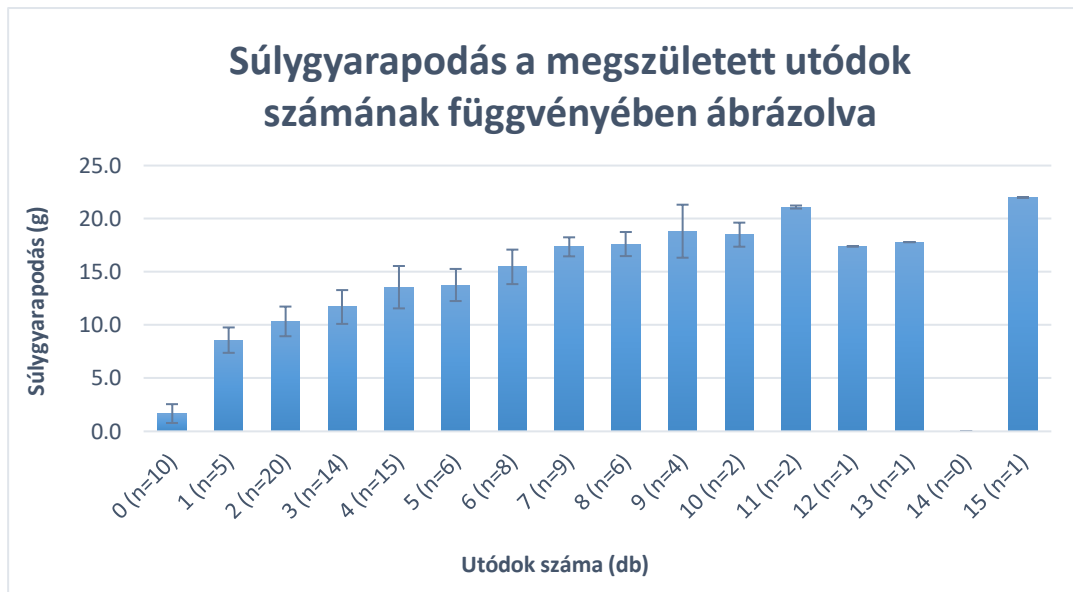
A vemhesülési és ellési arányokat külön is vizsgáltuk attól függően, hogy a recipiens nőstényekbe milyen embriók lettek beültetve (8. táblázat). Az egyes arányszámokra vonatkozóan 2023. áprilist megelőzően nem volt elég adatunk, emiatt csak az ezt követő időszakra tudtuk az összehasonlítást elvégezni. A legmagasabb arányok a rederivált vonalaknál és felolvasztott spermával termékenyített petesejteknel volt megfigyelhető, ami azzal magyarázható, hogy az embriót nem érintette fizikai károsodás, mint a mikroinjektált zigóták és embriók esetében, így magasabb volt a beültetés utáni túlélési és beágyazódási arány is.

8. táblázat Vemhesülési és ellési arányok összehasonlítása (Forrás: saját munka)



Vemhesség alatti súlygyarapodásból levont következtetések a születendő alomszám meghatározására, vemhesség alatt fellépő komplikációk figyelemmel kísérése:

A vemhesedés detektálása korábban szemrevételezés alapján történt a vemhesség középső időszakában, a második hét környékén, általában a 10-14. napon, mikor már szabad szemmel is jól látható a has megnagyobbodása. Ezzel a módszerrel nem mindig lehetett egyértelműen megállapítani a kis alomszámú nőstények vemhességét, más esetben pedig nyilvánvalóan csak az ellés előtt lehetett látni. A recipienseknél előfordulhat vetelés, illetve a megszületett alom elfogyasztása. Azzal a szándékkal, hogy biztosabb eredményekkel szolgálhassunk, bevezettük az állatok súlymérését (13. ábra).



13. ábra Recipiens nőstények súlygyarapodása a megszületett utódok számának függvényében (Forrás: saját munka)

A méréseket a beültetés után, a vemhesség közepén a tizedik nap környékén, és ellést megelőzően végeztük. A súlygyarapodás mérésével a vemhesség korábbi fázisában határozottan meg tudtuk állapítani az anyák vemhesedését, ami szabad szemmel csak későbbi időpontban lett volna detektálható. A normális súlygyarapodás a teljes vemhességi idő alatt hozzávetőlegesen 2-3 gramm körüli volt állatonként. Amennyiben a 8-10. nap környékén ennél magasabb értékeket észleltünk, az állatokat vemhesnek ítéltük meg. A súlygyarapodásból ezáltal következtetni tudtunk az embriók nem megfelelő fejlődésére is. A harmadik mérés alkalmával néhány esetben a súly visszaesését tapasztaltuk a második méréshez képest. Ilyenkor a vemhesség alatt fellépő spontán vetelés megállapítható volt. Ez jól elkülöníthető volt az alom elfogyasztásától, ugyanis az ellések többnyire abban az időszakban történtek, mikor az anyák nem észleltek mozgást, így általában nem tudtunk jelen lenni az ellés körüli időben.

A recipiens nőstények együtt voltak tartva a nevelési időszak előtt és után is, csupán az ellés idejére helyeztük el őket egyedileg. Az anyáknak a szoptatás és nevelés alatt igyekeztünk nyugodt környezetet biztosítani.

4.5. Született állatok felnevelése

Béranyák használata a felnevelés segítése szempontjából:

A recipiens anyák nevelési képességét figyelembe véve, a nem szoptató anyák helyettesítésére béranyákat használtunk, hogy a rosszul nevelő anyáktól származó almokat életben tudjuk tartani. Ehhez bigám tenyészetektől való anyák alá tettük be a kölyköket, melyek

sajátjukként befogadva szoptatták és nevelték fel őket. Emellett azokat a nőtényeket, melyek nem vemhesedtek, elkülönítettük a vemhes nőtényektől, ugyanis azt tapasztaltuk, hogy ezek az állatok stresszelik az ellésre készülő anyákat.

5. Következtetések és javaslatok

Számos tényező befolyásolhatja a különböző embriológiai munkák, többek között az *in vitro* fertilizáció és embriótranszfer sikerességét, a megszületendő alomszámot. Ilyen például a petesejtek és sperma megfelelő kezelése, az embriók és recipiensek genetikai háttere, a genetikai módosítások hatásai. A genetikai háttér eltérést mutatott a petesejtszámban és megtermékenyülésben. A génmódosítás szintén negatívan hatott ezekre a mutatószámokra.

Az álvemhesség kialakulását nagymértékben befolyásolhatja a nőtények hímek iránti fogékonysága, valamint az, hogy a nemi ciklus melyik szakaszában történik a párzás. Megfigyeléseink alapján a pluggal rendelkező nőtények közül csak az ösztrusz fázisban lévő, tág, átlátszó ampullájú egyedekbe ültetett embriók ágyazódtak be.

A hormonkezelésre adott válaszreakció meghatározza az ovulált oocyta-számot, ezért fontos a hormonok megfelelő dózisének és kezelés időpontjának beállítása. A szuperovuláció kiváltásának PMSG és hCG általi 17:00 és 18:00 órai időzítését 15:00-ra módosítottuk, illetve a PMSG 5 NE dózisének 7,5 NE-re emelve sikerült az nőtényenkénti átlagos ovulált és megtermékenyített petesejtek számát 241%-ra növelni. Ennek hatására a felhasznált állatok számát csökkenteni tudtuk.

A méh receptivitása és a beágyazódás függ az embrió és a méhnyálkahártya kölcsönhatásától, valamint a transzferált embriószámtól, illetve azok minőségétől. A beültetett embriók megszületési arányában az a tendencia mutatkozott meg az eddigi elemzések alapján, hogy mikroinjektált embriók esetében a 15-17, míg injektálás nélkül beültetett embriók esetében a 20-21, vagy azalatti embriószám magasabb születési arányokat mutat az esetek többségében. Azonban a nagy szórású értékek következtében további vizsgálatok szükségesek.

A műtéti technika és a beavatkozások alatti sterilitás is kulcsfontosságú tényező. Az embriótranszfer eltéréseket mutathat a beültetés anatómiai helyét illetően, amit az embrió fejlettségi állapota határoz meg, emiatt fontos az embriótranszfer alatti precíz munkavégzés. Az érzéstelenítés és fájdalomcsillapítás meghatározó a béranyák felépülésében és stressz csökkentésében. A vemhesség fenntartása az állatjóléttel is összefüggésbe hozható.

Fontos tehát az IVF és embrióbeültetés sikerességét befolyásoló tényezők folyamatos ellenőrzése, esetlegesen fellépő problémák észlelése során a hibák feltárása és azonnali megoldás keresése, vagy a módszeren való változtatás. Ehhez nélkülözhetetlen a

munkafolyamatok folyamatos és részletes dokumentálása az értékes adatokat kinyerése érdekében, melyekből elemzések után következtetéseket vonhatunk le.

Az ezt követő időszakban hasznos lehet az eddig nem dokumentált adatok további táblázatokba rögzítése, és kiértékelése, ugyanis számszerű adatokkal rávilágítva hatékonyabbá tehetjük az embriológiai folyamatok végkimenetelét, ezzel meggyorsítva az újabb transzgénikus állatok előállítását.

Későbbi terveink között szerepel a CARD HyperOva nevű ultra-szuperovulációs reagens kipróbálása is, amely a tüszőrepedés után akár 80 db ovulált petesejtet is eredményezhet az ajánlás alapján. Ez a felhasznált állatok számának további csökkentését tudná lehetővé tenni.

6. Összefoglalás

A tudományos publikációk hitelességéhez szükséges reprodukálható kísérleti eredmények felmutatásához nélkülözhetetlenek a kutatások tárgyköréhez igazított genetikailag módosított állatmodellek. A Kísérleti Orvostudományi Kutatóintézet idegrendszeri és viselkedésvizsgálati kutatásaihoz az Orvosi Géntechnológiai Részleg szolgáltató tevékenységével állítja elő ezeket az egérmodelleket. Egy-egy új vonal előállítása jellemzően több hónapot vesz igénybe. A teljes folyamat a génkonstrukciók elkészítésétől a génmódosított állatok megszületéséig több lépésből áll, melyek külön-külön is hosszú időt ölelnek fel. Eközben számos probléma léphet fel, melyek kihatással lehetnek a rendszer egészére, és visszafordíthatatlan következményekkel járhatnak. Ez a kísérletek megkezdését is akadályozhatja és késleltetheti.

Célunk a mikroinjektálással módosított zigóták és kétsejtes embriók túlélési rátájának növelése, illetve az embriókat kihordó béranyák vemhesülési százalékának javítása, ezzel az embriók megszületési arányának emelése volt, ami az új vonalak minél gyorsabb létrehozását teszi lehetővé. Ennek érdekében az embriológiai munkák monitorozásával és részfolyamatok kielemezésével kísérletet tettünk az addig alkalmazott protokollok felülvizsgálatára és új módszerek kipróbálására, amely néhány esetben javította a korábbi eredményeket. A következtetéseket a 2022. januártól 2023. októberig terjedő időszak 111 mikroinjektálási, 26 kórokozómentesítési, 16 vonalfeléllesztési munkáinak adataiból vontam le. Ez időszak alatt 2022-ben 3821, 2023. októberéig pedig 5357 embriót ültettünk be.

A korábbi alacsonyabb ovulált és megtermékenyített petesejtek mennyiségének korrigálására változtattunk a magasabb oocyta-számot előidéző szuperovulációt kiváltó hormonkezelések időzítésén, és a hormonok dózisának optimális beállításán. A PMSG és hCG 17:00 és 18:00 órai időzítését 15:00-ra módosítottuk, a PMSG 5 NE dózisát pedig 7,5 NE-re emeltük. A két változtatás együttes hatásával sikerült az nőtényenkénti átlagos ovulált és megtermékenyített petesejtek számát 241%-ra növelni. Ennek hatására a felhasznált állatok számát csökkenteni tudtuk.

A recipiens anyák nagyobb arányú vemhesedésére a pluggal rendelkező nőtényeket tovább szelektáltuk a petevezető és annak ampulla szakaszának szemrevételezésével, amely megfigyelésekkel el tudtuk különíteni az álvmehesség fennállását a párzás után annak hiányától, mely az embriók implantációja szempontjából meghatározó tényező volt. Ennek eredményeként megemelkedett a recipiens nőtények vemhesülési aránya. A vemhesülésre

kihatással volt az embriók minősége és genetikai háttere, a génmódosítás típusa, és az embriók beültetési állapota is, ezért a különböző technikákkal előállított embriókat külön kezeltük, melynek az eredményei a következők lettek: azok a recipiens nőstények, melyekbe *in vitro* fertilizációval előállított, mikroinjektált embriókat ültettünk, a vemhesülési arány 18%-kal, hagyományos pároztatásból származó mikroinjektált embriók esetében pedig 17,7%-kal nőtt. A kórokozómentesítés, vonalfelkészítés arányai a következőképpen alakultak: a rederiválásból származó embriók esetében 2,1%-kal, a felolvasztott spermával termékenyített petesejtek esetében 32%-kal, míg embriófelolvasztásból történő beültetés során 16,7%-kal nőtt a recipiens anyák vemhesülési aránya a tavalyi évhez képest. A legkisebb növekedés a rederivált embriók esetében figyelhető meg, azonban a vemhesedés aránya ennél a kategóriánál volt korábban is a legmagasabb arányú (átlagosan 95,5%), így a többi csoportnál nagyobb jelentőségű volt a javulás mértéke.

A vemhesülés javulásával 3 kategóriánál ekképpen nőtt a megszületett utódok aránya: rederivált vonaloknál 6,5%-os, felolvasztott spermával termékenyített petesejtekből származó embrióknál 17,9%-os, felolvasztás után beültetett embrióknál 11,9%-os emelkedést értünk el.

A megfigyelések során figyelembe vettük az állatok különböző genetikai háttereit és génmódosításait, ami a leginkább befolyásoló tényező volt a vizsgálatok során.

A módszerek finomításával javítani tudtunk az embriológiai technikák hatékonyságán bizonyos területeket illetően, továbbá a kísérleti állatok kutatási célú felhasználására vonatkozó 3R szabály reduction-csökkentés és refinement-tökéletesítés alapelvét is adaptálni tudtuk a munkafolyamatokba.

7. Köszönetnyilvánítás

Ezúton szeretném kifejezni hálás köszönetemet Dr. Erdélyi Ferencnek, aki végig támogatta egyetemi tanulmányaimat, szakmai tudása és segítsége nélkül nem jött volna létre ez a dolgozat. Külön köszönöm Dr. Gócza Elen szakmai segítségét, hasznos gyakorlati tanácsait, szakadatlan türelmét az utolsó pillanatokban is, valamint, hogy elvállalta belső konzulensem szerepét. Köszönettel tartozom segítőkészségéért és odaadó támogatásáért Erdélyi Zsuzsának. Szeretném megköszönni Geszterné Ecsédi Máriának a dolgozatban szereplő adatokhoz szükséges gyakorlati segítséget és támogatást, továbbá munkatársaim segítségét, amely hozzájárult a szakdolgozatom elkészüléséhez.

8. Irodalomjegyzék

Abel, M.H., Widen A., Wang X., Huhtaniemi I., Pakarinen P., Kumar T. R., Christian H. C. (2014): *Pituitary gonadotrophic hormone synthesis, secretion, subunit gene expression and cell structure in normal and follicle-stimulating hormone β knockout, follicle-stimulating hormone receptor knockout, luteinising hormone receptor knockout, hypogonadal and ovariectomised female mice*. *Journal of Neuroendocrinology*, 26(11), pp. 785-95.

DOI: [10.1111/jne.12178](https://doi.org/10.1111/jne.12178)

Ali, J., Whitten, W. K., Shelton, J. N. (1993): *Effect of culture systems on mouse early embryo development*. *Human Reproduction*, 8(7), pp. 1110–1114.

DOI: [10.1093/oxfordjournals.humrep.a138202](https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.humrep.a138202)

Almeida, P. A., Bolton, V. N. (1995): *The effect of temperature fluctuations on the cytoskeletal organisation and chromosomal constitution of the human oocyte*. *Zygote*, 3(04), pp. 357–365. DOI: [10.1017/s0967199400002793](https://doi.org/10.1017/s0967199400002793)

Austin, C. R., Braden, A. W. H. (1952): *Passage of the Sperm and the Penetration of the Egg in Mammals*. *Nature*, 170(4335), pp. 919–921. DOI: [10.1038/170919a0](https://doi.org/10.1038/170919a0)

Balbach, M., Gervasi, M. G., Hidalgo, D. M., Visconti, P. E., Levin, L. R., Buck, J. (2020). *Metabolic changes in mouse sperm during capacitation*. *Biology of Reproduction*. Volume 103(4), pp. 791–80. DOI: [10.1093/biolre/iaaa114](https://doi.org/10.1093/biolre/iaaa114)

Behringer, R., Gertsenstein, M., Nagy, K. V., Nagy, A. (2018): *Administration of Gonadotropins for Superovulation in Mice*. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2018(1), pdb.prot092403 DOI: [10.1101/pdb.prot092403](https://doi.org/10.1101/pdb.prot092403)

Braden, A.W.H., Austin, C.R. (1954): *The Fertile Life of Mouse and Rat Eggs*. *Science*, 120, pp. 610-611. DOI: [10.1126/science.120.3120.610](https://doi.org/10.1126/science.120.3120.610)

Braden, A.W.H. (1958): *Variation between strains of mice in phenomena associated with sperm penetration and fertilization*. *Journal of Genetics*, 56, pp. 37-47. Letöltés dátuma: 2023. 10. 25. forrás: <https://www.ias.ac.in/public/Volumes/jgen/056/01/0037-0047.pdf>

- Braden, A.W.H. (1960): *Genetic influences on the morphology and function of the gametes*. Journal of Cellular and Comparative Physiology 56, (Suppl. 1): 17-29.
- Chaible, L. M., Corat, M. A., Abdelhay, E., Dagli, M. L. Z. (2010): *Review article Genetically modified animals for use in research and biotechnology*. Genetics and Molecular Research, 9(3), pp. 1469–1482. DOI: [10.4238/vol9-3gmr867](https://doi.org/10.4238/vol9-3gmr867)
- Chaible, L. M., Kinoshita, D., Finzi Corat, M. A., Zaidan Dagli, M. L. (2013): *Genetically Modified Animal Models*. Animal Models for the Study of Human Disease, pp. 811–831. DOI:[10.1016/b978-0-12-415894-8.00033-6](https://doi.org/10.1016/b978-0-12-415894-8.00033-6)
- Conner, D. A. (2004): *Transgenic Mouse Production By Zygote Injection*. Current Protocols in Molecular Biology, 23(9), pp. 1–29. DOI: [10.1002/0471142727.mb2309s68](https://doi.org/10.1002/0471142727.mb2309s68)
- Edwards, R.G., Gates, A.H. (1959): *Timing of the stages of the maturation divisions, ovulation, fertilization and the first cleavage of eggs of adult mice treated with gonadotrophins*. Journal of Endocrinology, 18(3), pp. 292-304. DOI: [10.1677/joe.0.0180292](https://doi.org/10.1677/joe.0.0180292)
- Errijgers, V., Van Dam, D., Gantois, I., Van Ginneken, C. J., Grossman, A. W., D’Hooge, R., De Deyn, P.P., Kooy, R. F. (2007): *FVB.129P2-Pde6b+Tyrc-ch/Ant, a sighted variant of the FVB/N mouse strain suitable for behavioral analysis*. Genes, Brain and Behavior, 6(6), 552–557. DOI:[10.1111/j.1601-183X.2006.00282.x](https://doi.org/10.1111/j.1601-183X.2006.00282.x)
- Fields, S., Johnston, M. (2005): *Whither model organism research?* Science, 307, pp. 1885–1886. DOI: [10.1126/science.1108872](https://doi.org/10.1126/science.1108872)
- Fox, M. A. (1986): *The Case for Animal Experimentation: An Evolutionary and Ethical Perspective*. Berkeley and Los Angeles, California: University of California Press.
- Freeman, L.A. (2013): *Lipoproteins and Cardiovascular Disease - Methods and Protocols*, In: Liu, C., Xie, W., Gui, C., Du, Y. (2013): *Pronuclear Microinjection and Oviduct Transfer Procedures for Transgenic Mouse Production*. Lipoproteins and Cardiovascular Disease. Totowa-New Jersey: Humana Press, pp. 217–232. DOI: [10.1007/978-1-60327-369-5_10](https://doi.org/10.1007/978-1-60327-369-5_10)
- Gordon, J. W., Scangos, G. A., Plotkin, D. J., Barbosa, J. A., Ruddle, F. H. (1980): *Genetic transformation of mouse embryos by microinjection of purified DNA*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 77(12), pp. 7380–7384. DOI: [10.1073/pnas.77.12.7380](https://doi.org/10.1073/pnas.77.12.7380)

Hasegawa, A., Mochida, K., Ogonuki, N., Hirose, M., Tomishima, T., Inoue, K., Ogura, A. (2017): *Efficient and scheduled production of pseudopregnant female mice for embryo transfer by estrous cycle synchronization*. *Journal of Reproduction and Development*, 63(6), pp. 539–545. DOI: [10.1262/jrd.2017-068](https://doi.org/10.1262/jrd.2017-068)

Ishizuka, Y., Nishimura, M., Matsumoto, K., Miyashita, M., Takeo, T., Nakagata, N., Anzai, M. (2013): *The influence of reduced glutathione in fertilization medium on the fertility of in vitro-matured C57BL/6 mouse oocytes*. *Theriogenology*, 80(5), pp. 421–426. DOI: [10.1016/j.theriogenology.2013.07.002](https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2013.07.002)

Kaufman, M. H. (1995): *The Atlas of Mouse Development, Revised Edition*, London: Academic Press.

Lamas, S., Franquinho, F., Morgado, M., Mesquita, J. R., Gärtner, F., Amorim, I. (2020): *C57BL/6J and B6129F1 Embryo Transfer: Unilateral and Bilateral Transfer, Embryo Number and Recipient Female Background Control for the Optimization of Embryo Survival and Litter Size*. *Animals*, 10(8), p. 1424. DOI: [10.3390/ani10081424](https://doi.org/10.3390/ani10081424)

Lamas, S., Carvalheira, J., Gartner, F., Amorim, I. (2021): *C57BL/6J mouse superovulation: schedule and age optimization to increase oocyte yield and reduce animal use*. *Zygote*, pp. 1–5. DOI: [10.1017/S0967199420000714](https://doi.org/10.1017/S0967199420000714)

Leonard, S.L., Perlman, P.L, Kurzrok, R. (1947): *Relation between Time of Fertilization and Follicle Cell Dispersal in Rat Ova*. *Experimental Biology and Medicine*, 66(3), pp. 517–518. DOI: [10.3181/00379727-66-16141p](https://doi.org/10.3181/00379727-66-16141p)

Lewis, W.H., Wright, E.S. (1935): *On the early development of the mouse egg*. Carnegie Institution of Washington, Pub. No. 459: 133-144.

Liu, C., Xie, W., Gui, C., Du, Y. (2013): *Pronuclear Microinjection and Oviduct Transfer Procedures for Transgenic Mouse Production*. *Lipoproteins and Cardiovascular Disease*, pp. 217–232. DOI: [10.1007/978-1-60327-369-5_10](https://doi.org/10.1007/978-1-60327-369-5_10)

Low B.E., Taft R.A., Wiles M.V. (2016): *Mouse Sperm Cryopreservation and Recovery of Genetically Modified Mice*. *Methods In Molecular Biology*. 1438, pp. 55-56. DOI: [10.1007/978-1-4939-3661-8_3](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3661-8_3)

Mähler, M., Berard, M., Feinstein R., Gallagher A., Illgen-Wilcke, B., Pritchett-Corning, K., Raspa, M. (2014): *FELASA recommendations for the health monitoring of mouse, rat, hamster, guinea pig and rabbit colonies in breeding and experimental units*. *Laboratory Animals*. 48(3), pp. 178–192. DOI: [10.1177/0023677213516312](https://doi.org/10.1177/0023677213516312)

Maloy, S., Hughes, K. (2013): *Brenner's Encyclopedia of Genetics, Second edition*, Amsterdam: Elsevier/Academic Press, pp. 409-410.

Mattapallil, M. J., Wawrousek, E. F., Chan, C.-C., Zhao, H., Roychoudhury, J., Ferguson, T. A., Caspi, R. R. (2012): *The Rd8 Mutation of the Crb1 Gene Is Present in Vendor Lines of C57BL/6N Mice and Embryonic Stem Cells, and Confounds Ocular Induced Mutant Phenotypes*. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 53(6), pp. 2921-2927. DOI: [10.1167/iovs.12-9662](https://doi.org/10.1167/iovs.12-9662)

Mayor, S. (2002): *Mouse genome shows many disease genes shared with humans*. *BMJ*, 325(7376), p. 1319. DOI: [10.1136/bmj.325.7376.1319](https://doi.org/10.1136/bmj.325.7376.1319)

Murphy D., Carter, D.A. (1993): *Methods in Molecular Biology, Volume 18. Transgenesis Techniques, Principles and Protocols*. Totowa-New Jersey: Humana Press, In: Murphy, D. Vasectomizing a Mouse, pp. 137–140. DOI: [10.1385/0-89603-245-0:137](https://doi.org/10.1385/0-89603-245-0:137)

Nagy, A., Gertsenstein, M., Vintersten, K., Behringer, R. (2003): *Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual*. Third Edition. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press

Oakberg, E. F. (1956): *A description of spermiogenesis in mouse and its use in analysis of the cycle of the seminiferous epithelium and germ cell renewal*. *The American Journal of Anatomy*. 99(3). pp. 391-413. DOI: [10.1002/aja.1000990303](https://doi.org/10.1002/aja.1000990303)

Pincus, G. (1936): *The Eggs of Mammals*. New York: The Macmillan Company, p. 161.

Quinn, P., Kerin, J. F., Warnes, G. M. (1985): *Improved pregnancy rate in human in vitro fertilization with the use of a medium based on the composition of human tubal fluid*. *Fertility and Sterility*, 44(4), pp. 493–498. DOI: [10.1016/s0015-0282\(16\)48918-1](https://doi.org/10.1016/s0015-0282(16)48918-1)

Russell, W.M.S., Burch, R. L. (1959): *The Principles of Humane Experimental Technique*. London: Methuen & Co.

Saiz, N., Plusa, B. (2013): *Early cell fate decisions in the mouse embryo*. *Reproduction*, 145(3), pp. R65–R80. DOI: [10.1530/REP-12-0381](https://doi.org/10.1530/REP-12-0381)

Silver, L. M. (1995): *Mouse Genetics: Concepts and Application*, New York: Oxford University Press.

Suzuki, H., Yorozu, K., Watanabe, T., Nakura, M., Adachi, J. (1996): *Rederivation of Mice by Means of In Vitro Fertilization and Embryo Transfer*. *Experimental Animals*, 45(1), pp. 33–38. DOI: [10.1538/expanim.45.33](https://doi.org/10.1538/expanim.45.33)

Taft, R. (2017): *In Vitro Fertilization in Mice*. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2017(11), pp-886-892. DOI: [10.1101/pdb.prot094508](https://doi.org/10.1101/pdb.prot094508)

Takeo, T., Nakagata, N. (2018): *In Vitro Fertilization in Mice*. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2018(6), [pdb.prot094524](https://doi.org/10.1101/pdb.prot094524). DOI: [10.1101/pdb.prot094524](https://doi.org/10.1101/pdb.prot094524)

Tsuchida, M., Sakurai, D., Komura, N., Nakagata, N., Suzuki, H. (2021): *Induction of oestrus by administering Inhibin antiserum along with equine chorionic gonadotropin in anoestrous bitches*. *Reproduction in Domestic Animals*.pp 1-8. DOI: [10.1111/rda.14004](https://doi.org/10.1111/rda.14004)

Turnbull, D.H. (1999): *In utero ultrasound backscatter microscopy of early stage mouse embryos*. *Computerized Medical Imaging and Graphics*, 23(1), pp. 25–31. DOI: [10.1016/s0895-6111\(98\)00060-3](https://doi.org/10.1016/s0895-6111(98)00060-3)

Vergara, G. J., Irwin, M. H., Moffatt, R. J., Pinkert, C. A. (1997): *In vitro fertilization in mice: Strain differences in response to superovulation protocols and effect of cumulus cell removal*. *Theriogenology*, 47(6), pp. 1245–1252. DOI: [10.1016/s0093-691x\(97\)00104-0](https://doi.org/10.1016/s0093-691x(97)00104-0)

Wessel, G.M., Brooks J.M., Green E., Haley S., Voronina E., Zayfudium V., Conner S. (2001): *The biology os cortical granules*. *Internal Review of Cytology*. 209, pp. 117-206 DOI: [10.1016/s0074-7696\(01\)09012-x](https://doi.org/10.1016/s0074-7696(01)09012-x)

Wilburn, D. B., Swanson, W. J. (2018): *Gamete Structure: Egg, Comparative Vertebrate*. *Encyclopedia of Reproduction*, pp. 204–209. DOI:[10.1016/B978-0-12-809633-8.20557-8](https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809633-8.20557-8)

Yang, J. J., Larsen, C. M., Grattan, D. R., Erskine, M. S. (2009): *Mating-Induced Neuroendocrine Responses During Pseudopregnancy in the Female Mouse*. *Journal of Neuroendocrinology*, 21(1), pp. 30–39. DOI: [10.1111/j.1365-2826.2008.01803.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2826.2008.01803.x)

Weboldalak:

B6BALB/cF1: Letöltés dátuma: 2023.09.17. forrás: <https://www.jax.org/strain/100007>

C57BL/6J: Letöltés dátuma: 2023.09.17. forrás: <https://www.jax.org/strain/000664>

CARD IVF protokollja. Letöltés dátuma: 2023.09.17. forrás:
<https://medschool.vanderbilt.edu/vcmr/recovery-protocols/ivf-card-protocol/>

Fact about stem cells kiadvány. Letöltés dátuma: 2009 körül. forrás:
<https://stemcells.nih.gov/info/basics/stc-basics/>

The Jackson Laboratory honlapja. Letöltés dátuma: 2023.09.17. forrás: <https://www.jax.org/>

9. Ábrák és táblázatok jegyzéke

Ábrajegyzék

1. ábra Embriológia labor (Forrás: saját fotó).....	4
2. ábra Az embrionális fejlődés szakaszai (Forrás: https://stemcells.nih.gov/info/basics/stc-basics/ , módosítva Gócza Elen által).....	10
3. ábra Az egér preimplantációs fejlődésének szakaszai (Forrás: Saiz és Plusa, 2013, szerkesztve).....	12
4. ábra Mikroinjektálás sematikus rajz (Forrás: Chaible et al., 2013, szerkesztve).....	18
5. ábra Kétsejtes embrió mikroinjektálása (Forrás: saját fotó)	19
6. ábra B6FVB/AntF1 recipiens anya kölykeivel (Forrás: saját fotó).....	20
7. ábra Szellőztetett ketrecrendszer (Forrás: KOKI)	26
8. ábra Embriók mosása SPF öltözőkben (Forrás: KOKI)	28
9. ábra Plugos recipiens szűk (balra) és kitágult (jobbra) ampullával (Forrás: saját fotó)	34
10. ábra Recipiens nőtények vemhesülési %-a mikroinjektált és nem injektált embriók tekintetében (Forrás: saját munka)	37
11. ábra Recipiens nőtények vemhesülési %-a mikroinjektált, IVF-fel előállított embriókra vonatkoztatva (Forrás: saját munka)	39
12. ábra IVF-fel előállított és mikroinjektált beültetett embriók megszületési aránya (Forrás: saját munka)	39
13. ábra Recipiens nőtények súlygyarapodása a megszületett utódok számának függvényében (Forrás: saját munka)	41

Táblázatjegyzék

1. táblázat Hormonkezelés időpontjának hatása a petesejtszámra (Forrás: saját munka) **Error! Bookmark not defined.**
2. táblázat Genetikai hátterek között megfigyelhető átlagos megtermékenyített petesejtszám különbségek (Forrás: saját munka).....**Error! Bookmark not defined.**
3. táblázat Hormonkezelés hatása az embriószámra (Forrás: saját munka)33
4. táblázat Álvemhességet mutató recipiens nőtények aránya 2023. július-szeptember időszakában (Forrás: saját munka)35
5. táblázat Recipiensek vemhesülési %-a 2022. január-szeptemberi időszakában (Forrás: saját munka)36
6. táblázat Recipiensek vemhesülési %-a 2023. január-szeptemberi időszakában (Forrás: saját munka)36
7. táblázat Beültetett embriószám és megszületett utódok összefüggései (Forrás: saját munka)38
8. táblázat Vemhesülési és ellési arányok összehasonlítása (Forrás: saját munka)**Error! Bookmark not defined.**

10. Mellékletek

1. sz. melléklet

2022 Megszületett utódok aránya (%)					
	PMI		PMI nélküli		
	IVF	hagyományos	rederiválás	felolvasztott sperma	felolvasztott embrió
január	13	-	14	-	-
február	31	-	14	0	18
március	22	9	-	-	-
április	13	-	14	-	-
május	8	28	-	-	-
június	18	9	46	-	-
július	21	9	51	-	28
augusztus	nem osztódott	-	-	-	0
szeptember	20	30	17	34	-
október	20	40	36	-	-
november	21	12	26	25	-
december	21	-	-	18	-
átlag	19,1	19,7	27,3	19,3	15,1
szórás	6,0	13,0	15,2	14,4	14,0

2. sz. melléklet

2023 Megszületett utódok aránya (%)					
	PMI		PMI nélküli		
	IVF	hagyományos	rederiválás	felolvasztott sperma	felolvasztott embrió
január	16	28	33		0
február	14	18	45		
március	28	18	24	27	
április	14	7	-		54
május	11	12	-		
június	17	-	29	54	
július	15	-	-	31	
augusztus	19	25	-		
szeptember	22	-	38		
átlag	17,2	18,0	33,8	37,2	27,0
szórás	5,1	7,8	8,1	14,5	38,2

11. Hallgatói nyilatkozat

NYILATKOZAT

a szakdolgozat nyilvános hozzáféréséről és eredetiségéről

A hallgató neve: Kovács Márta Melinda

A Hallgató Neptun kódja: XN18HC

A dolgozat címe: Az embriológiai technikák optimalizálása pronukleáris és kétsejtes sejtmagi mikroinjektálással előállított génmódosított egerek esetében

A megjelenés éve: 2023

A konzulens intézetének neve: MATE Genetika és Biotechnológia Intézet

A konzulens tanszékének a neve: Állatbiotechnológia Tanszék

Kijelentem, hogy az általam benyújtott szakdolgozat egyéni, eredeti jellegű, saját szellemi alkotásom. Azon részeket, melyeket más szerzők munkájából vettem át, egyértelműen megjelöltem, és az irodalomjegyzékben szerepeltettem.

Ha a fenti nyilatkozattal valótlant állítottam, tudomásul veszem, hogy a záróvizsga-bizottság a záróvizsgából kizár és a záróvizsgát csak új dolgozat készítése után tehetek.

A leadott dolgozat, mely PDF dokumentum, szerkesztését nem, megtekintését és nyomtatását engedélyezem.

Tudomásul veszem, hogy az általam készített dolgozatra, mint szellemi alkotás felhasználására, hasznosítására a Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem mindenkori szellemi tulajdon-kezelési szabályzatában megfogalmazottak érvényesek.

Tudomásul veszem, hogy dolgozatom elektronikus változata feltöltésre kerül a Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem könyvtári repozitori rendszerébe. Tudomásul veszem, hogy a megvédett és

- nem titkosított dolgozat a védést követően
- titkosításra engedélyezett dolgozat a benyújtásától számított 5 év eltelte után

nyilvánosan elérhető és kereshető lesz az Egyetem könyvtári repozitori rendszerében.

Kelt: 2023 év 11 hó 03 nap

Kovács Márta Melinda
Hallgató aláírása

12. Konzulensi nyilatkozat


NYILATKOZAT

Kovács Márta Melinda (hallgató Neptun azonosítója: XN18HC) konzulenseként nyilatkozom arról, hogy a szakdolgozatot áttekintettem, a hallgatót az irodalmi források korrekt kezelésének követelményeiről, jogi és etikai szabályairól tájékoztattam.

A szakdolgozatot a záróvizsgán történő védésre **javaslom** / nem javaslom.

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

Kelt: Gödöllő, 2023 év november hó 3 nap



belső konzulens

Gócza Elen

MTA levelező tagja

tudományos tanácsadó

tanszékvezető

MATE, GBI, Állatbiotechnológia tanszék