



**SZENT ISTVÁN EGYETEM**

**Állattenyésztés-tudományi Doktori Iskola**

NYÚLEMBRIÓK ELŐÁLLÍTÁSA *IN VITRO* ÉS MIKROMANIPULÁCIÓS MÓDSZEREKKEL,  
VALAMINT EMBRIÓ MÉLYHŰTÉS FEJLESZTÉSE AZ ELŐBBI ELJÁRÁSOK  
TÁMOGATÁSÁRA

Doktori értekezés tézisei

**Polgár Zsuzsanna**

Gödöllő

2012

**A doktori iskola**

**megnevezése:** **Állattenyésztés-tudományi Doktori Iskola**

**tudományága:** **Állattenyésztés-tudomány**

**vezetője:** **Professzor Dr. Mézes Miklós D.Sc., akadémikus**

Tanszékvezető, egyetemi tanár

Szent István Egyetem Mezőgazdaság- és Környezettudományi Kar,

Állattudományi Alapok Intézet, Takarmányozástani Tanszék

**témavezető:** **Professzor Dr. Dinnyés András D.Sc.**

Laboratóriumvezető, egyetemi tanár

Szent István Egyetem Mezőgazdaság- és Környezettudományi Kar,

Állattudományi Alapok Intézet, Molekuláris Állatbiotechnológiai

Laboratórium

.....  
Az iskolavezető jóváhagyása

.....  
A témavezető jóváhagyása

# 1. AZ ÉRTEKEZÉS ELŐZMÉNYEI, CÉLKITŰZÉSEK

## 1.1. Előzmények

A nyúl egy fontos modell állat, amely széles körben alkalmazható különböző emberi betegségek tanulmányozása során. Fizio-patológiai hasonlóságai miatt gyakran használják modellállatként szív és érrendszeri, légúti és fertőző, valamint rákos megbetegedések vizsgálatakor. Régóta kulcsfontosságú szerepet tölt be a korai humán embrionális fejlődés kutatásában is, annak köszönhetően, hogy a nyúl ezen tulajdonságában közelebb áll a főemlősökhöz, mint a rágcsálókhoz. Olyan humán betegségek vizsgálatához, melynél ismert a genetikai probléma, előállíthatók olyan genetikailag módosított (transzgénikus) állatok, amelyek alkalmasak a betegség modellezésére és gyógyszerek tesztelésére. Transzgénikus állatokban a genetikai örökítő anyagban hozunk létre változást egy új vagy megváltoztatott működésű gén bevitelével, illetve egy jelen lévő gén kicserélésével vagy kiütésével. Ezt általában úgy érjük el, hogy egy adott génkonstrukciót egy zigóta elömagvába injektálunk (mikroinjektálás), ez a technika azonban nem teszi lehetővé az irányított génbeépülést. Egy finomabb módszer az embrionális őssejt technológia, amellyel olyan genetikai módosított állatok hozhatók létre, ahol a génbevitel homológ rekombináción alapul. Ezt egészen már húsz éve alkalmazzák, azonban nyúl esetében még nem megoldott, és ennek hiánya komolyan akadályozza e modellállat teljes körű kihasználtságát. Más állatfajok, mint például sertés, juh vagy a szarvasmarha esetében, ahol szintén nem működik az embrionális őssejt technológia, genetikailag módosított testi sejteken alapuló sejtmag-átültetési klónozás nyújt technikai megoldást erre a problémára. Tehát a testi sejtes klónozásnak, mint technológiai rendszernek nagy jövője lehet a transzgénikus nyúl hatékony létrehozásában.

A klónozás hatékonysága elég alacsony és nagyszámú petesejtet igényel, ezért a 3R szabályt szem előtt tartva vágóhídi petefészekből *in vitro* maturációval állítanak elő érett petesejteket. Az *in vitro* petesejtérlelés gyakorlati hasznosításának számos jelentősége lehet. Például a daganatos betegségekben szenvedő fiatal nők esetében a tartós kemoterápia és besugárzás előtt a betegek petefészekéből kinyert petesejtjeinek illetve petefészek graftjainak a mélyhűtéssel történő tárolását követően, a felolvasztás után, ahhoz hogy a petesejtek termékenyítésre alkalmas állapotba kerüljenek maturáltatni kell őket. A maturáció után termékenyített petesejt már alkalmas arra, hogy az anyába való beültetését követően gyermek fejlődjön belőle. A petesejtérlelésnek állatok esetében is fontos szerepe van. Veszélyeztetett állatfajok elpusztult nőtény egyedeiből a még időben eltávolított petefészket mélyhűtve

tárolhatjuk, vagy pedig a belőlük kinyert petesejtekből génbankokat hozhatunk létre (ex situ génmegőrzés). Ha a későbbiekben a petesejtekből utódokat szeretnénk létrehozni, és egy fajazonos nőtény, valamint elegendő mennyiségű fajazonos sperma is rendelkezésünkre áll, akkor a mélyhűtéssel tárolt petesejtek felolvasztása után, *in vitro* körülmények között érleltetjük a nőivarsejteket. Ezen érett petesejtek termékenyítése után létrehozhatunk egy szaporulatot, amely ennek a veszélyeztetett állatfajnak az egyedszámbeli növekedését eredményezheti.

A mélyhűtési eljárások általában hatékonyabbak érettebb, több sejtes embriókon. A nagyobb sejtszám és struktúra miatt jobb a túlélési esélye ezeknek az embrióknak. A nyúlak sajátos a korai embriófejlődése, melynek során a petevezetőn végighaladó és fejlődő embrióra egy mucin réteg rakódik, ami segíti az embriót a méhben való beágyazódásában. *In vitro* körülmények közt előállított embriók esetében ez a mucin réteg hiányzik, ami megnehezítheti a későbbi preimplantációs embriók (blasztociszta) visszaültetését az anyaméhbe. Általában a jobb vemhesülés érdekében korai embriókat (zigóta, 2-4 sejtes embrió) ültetnek vissza a petevezetőbe. Ezért nyúl esetében célszerű ezen korai embriók mélyhűtve tárolása.

## **1.2. Az értekezés célkitűzései**

- Munkám célja az volt, hogy a nyúl testi sejtes klónozási technológiát adaptáljam Magyarországon és hogy növeljem a módszer hatékonyságát
- Maturációs vizsgálataim célja az volt, hogy az *in vitro* nyúlpetesejt- érleltetést egy eredményes és hatásos módszerét dolgozzam ki
- További feladatomból volt még két mélyhűtési eljárás kipróbálása és összehasonlítása korai nyúl embriókon.

## 2. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

### 2.1. Az alkalmazott nyúlfajta

Az *in vitro* maturációs kísérletekhez felhasznált nyúlpetefészkeket az Olívia Kft által üzemeltetett lajosmizsei nyúlvágóhídról származtak. A további kísérleteben használt Hycote hibrid nyulak a Mezőgazdasági Biotechnológiai Kutatóközpont mesterséges szellőztetéssel, 12 órás fényprogrammal ellátott állatházában, háromszintes, fém rácsketrecekben voltak elhelyezve. Az állatkísérletek a XXVIII/1998 törvény §25 és a 243/1998 (XII. 31) és 36/1999 (IV. 2) Kormányrendelet előírásainak figyelembe vételével zajlottak.

### 2.2. Az *In Vitro* Maturációs (IVM) rendszer

A petefészkeket a vágóhídról a laboratóriumig antibiotikummal kiegészített PBS oldatban, 2 különböző hőmérsékleten (32°C és 37°C) szállítottuk. A kinyerést követően a petesejteket két eltérő hőmérsékleten inkubáltuk 37°C-on és 38,5°C-on, 98% pára- és 5% CO<sub>2</sub> tartalom mellett 16 órán keresztül.

Az első kísérletsorozat alatt a TCM-199 alapú IVM médiumot a petesejtek egyik csoportjánál növekedési faktorokkal (IGF-I (50ng/ml) és EGF (10ng/ml)) és hormonokkal (hCG (5 IU/ml) és PMSG (5 IU/ml)) egészítettük ki, míg az ivarsejtek másik csoportjánál nem alkalmaztuk ezt a kiegészítést.

A második kísérletsorozatnál az előzőek mellé még 10% és 20% FCS tartalmú IVM médium csoportokat is vizsgáltunk. A 16 órás maturációt követően a petesejtek felszínéről 0,1%-os hialuronidáz oldattal eltávolítottuk a kumuluszsejteket. A további élettani kísérletekhez (parthenogenetikus aktiválás) felhasználni kívánt petesejteket szteretomikroszkóp alatt bíráltuk el, azokat tekintettük érettnek, melyeken az első sarkitest kiválása detektálható volt. Fejlődési kontrollként *in vivo* érett petesejteket használtunk. A többi petesejtet a meiotikus állapot megítélése céljából fixáltuk (ecetsav etil alkohol 1:3 arányú keverékében 24 óráig) és 1%-os Orceinnel (45%-os ecetsavban, 3 perc) megfestettük, majd fáziskontraszt mikroszkóppal megállapítottuk a petesejtek érési állapotát.

Az érés dinamikáját vizsgáló kísérletek folyamán, az inkubáció során 3 óránként mintát gyűjtöttünk és fixáltunk, majd az előbb említett módszerrel értékeltük.

### **2.3. A testisejtmag-átültetési (NT) rendszer**

Ivarérett, 19-22 hetes Hycole hybrid nőtény nyulakat szuperovuláltattunk intramuszkulárisan beadott 120 IU PMSG, majd 72 órával később fülvénába injektált 180 IU hCG alkalmazásával. A donor állatok életének humánus kioltása után, az érett petesejteket 13-14 órával a hCG beadása után a petevezetőből kimostuk 10%FCS tartalmú PBS-sel. A petesejteket 5 mg/ml hialuronidázt tartalmazó M199-es oldattal denudáltuk. A petesejteket manipuláció előtt 20 percre 5µl/ml Hoechst 33342 tartalmú tenyésztő médiumban inkubáltuk, majd az enukleációt szobahőmérsékleten, 7.5 µg/ml cytochalasin B-t tartalmazó oldatban végeztük.

A testi sejtes klónozáshoz a donorsejteket a petesejteket körülvevő kumulusz sejtek szolgáltatják, amiket mikropipetta segítségével jutattunk az enukleált petesejt perivitellinális részébe. A citoplaszt-sejt konstrukciót fúziós elektródok közt, megfelelő orientációban, elektromos impulzusokkal fuzionáltattuk. Egy óra elteltével a fuzionált sejteket azonos paraméterekkel aktiváltuk, majd egy órára 2 mM 6-DMAP-t és 5 µg/ml CHX-t tartalmazó EBSS médiumba helyeztünk. Ezután a klónozott (NT) embriókat EBSS tenyésztő médiumban, illetve 5nM TSA-t tartalmazó EBSS médiumban tenyésztettük 10 órán keresztül. A parthenogenetikus (PGA) kontroll embriókat a klónozásnál használt aktivációval állítottuk elő.

Az NT embriók 2-, 4-sejtes állapotban a klónozást követő nap reggelén lettek beültetve önmagukban vagy PGA embriókkal együtt. Laparoszkopos technikával 10-16 embriót ültettünk egy-egy petevezetőbe az infundibulumon keresztül. A recipiens nőtényeket 0.2 ml i.m. GnRH analóggal indukáltuk, 22 órával később, mint a petesejt donor nőtényeket. A vemhesség a beültetést követő 10. napon tapintással lett detektálva. Egy recipiens természetes úton lefialt, de a többi nőtény császármetszéssel estett át, majd dajka anyához kerültek az életképes utódok. A kisnyulakat naponta lemértük, szoptatás előtt és után, és feljegyeztük napi testtömeggyarapodásukat.

### **2.4. *In vivo* és *in vitro* embrió előállítás**

Az *in vivo* embriókat az előzőekben leírt módon szuperovuláltatott anyanyulak természetes termékenyítéséből nyertük. A zigótákat a petesejtekhez hasonlóan nyertük ki. A mélyhűtési kísérletig az *in vivo* zigótákat EBSS-es tenyésztőmédiumban tartottuk.

Az *in vitro* embriók előállításához szuperovuláltatott anyanyulak petesejtjeit és baknyulak spermáját használtuk. A bakokat anyára ugrattuk, az ondó levételéhez IMV műhüvelyt használtunk. A levett spermát lefugáltuk, majd a pelletet felszuszpendáltuk 10 ml HIS

oldatban és 15 percre a termosztátba helyeztük. További mosás után a spermát fel úsztattuk (swim up) majd 12 órát kapacitáltattuk. A fertilizációhoz 4 lyukú tenyésztőedény (NUNC<sup>TM</sup>) minden lyukába 500 µl kapacitált spermát és 5-6 db COC-t tettünk, majd 6-8 órára 38,5°C-os, 5%-os CO<sub>2</sub> és 98 %-os páratartalmú inkubátorba helyeztük. A fertilizáció után a zigótákat megtisztítottuk a spermiumoktól és a még fenn maradt kumulusz sejtektől. A mélyhűtési kísérletig az *in vitro* zigótákat EBSS-es tenyésztőmédiumban tartottuk.

## **2.5. Szilárd felszínű vitrifikációs (SSV) technika**

A nyúl zigóták mélyhűtéséhez az egyik eljárás, amit alkalmaztunk, az úgynevezett SSV technika, melyet eredetileg Dinnyés és munkatársai írtak le 2000-ben szarvasmarhán. A vitrifikációs eljárás során 35% etilén glikol, 5% polivinil-pirrolidon és 0.4 M trehalóz védőanyag tartalmú CZB-H vitrifikációs oldatot használtunk. A zigótákat 5-10 percig 4%-os EG oldatban ekvilibráltattuk szobahőmérsékleten. Majd 25-30 másodperc alatt az 5-10 zigótát tartalmazó csoportokat háromszor átmostuk vitrifikációs médium cseppekben, és 1-2 µl-es médium mennyiségben egy előre -150 —180°C -ra lehűtött fém doboz felszínére cseppentettük ki. A felület megfelelő hőmérsékletét a fémdoboz félig folyékony nitrogénbe való merítésével értük el. A hirtelen lehülés hatására a médiumcseppek apró golyócskák formájában szilárdulnak meg, amelyeket lehűtött csipesszel egy folyékony nitrogénnel teli fagyasztócsőben gyűjtöttünk össze. Felolvasztáshoz az apró golyócskákat 37°C-os 0.3 M trehalóz tartalmú oldatba helyeztük 1 percre, majd 2-2 percre 0,15 M illetve 0.075M-os szacharóz oldatban mostuk át a zigótákat, folyamatosan kioldva ezzel a védőanyagot. Ezután CZB-H oldatba, majd végül tenyésztő médiumba kerültek az embriók. A túlélési arányt, az osztódási valamint a blasztociszta (96h) fejlődést feljegyeztük, az embriókat Hoechst 33342-el megfestettük és UV megvilágítás mellett megszámloltuk az élő sejteket.

## **2.6. Műszalmás vitrifikációs technika (VS3a)**

A másik eljárás, amit a nyúl zigótákon alkalmaztunk, egy műszalmában történő mélyhűtési technika. Az eljárást Kasai és munkatársai által 1990-ben leírtak szerint végeztünk, kisebb módosításokkal. A vitrifikációs oldat 40% EG, 5% PVP és 0.4 M trehalózt tartalmazott (VS3a). Az eljárás során a zigóta állapotú embriókat 5-10 percre 4% EG-t tartalmazó oldatban ekvilibráltattuk szobahőmérsékleten. Ezután az előzetesen feltöltött 0,25ml-es műszalma VS3a védőanyagot (krioprotektánst) tartalmazó részébe töltöttük az embriókat. A műszalmát lezártuk és egy perc után nitrogén gőzébe (-180°C-ra) tettük. Három perccel később a

műszalmát folyékony nitrogén alá süllyesztettük. Felolvasztás során a műszalmát 10 másodpercre kivettük a nitrogénből, majd 15-20 másodpercig 37°C-os vízfürdőbe merítettük. A felolvasztott szalmából az embriókat 1 percre 37°C-os, 0.3 M-os trehalóz oldatba tettük. A rehidratáció érdekében egyre csökkenő koncentrációjú trehalóz oldatban mostuk át a zigótákat, majd végül az SSV-hez hasonlóan tenyésztőmédiumba helyeztük őket. Az értékelést az előzőekkel megegyező módon végeztük

## **2.7. Eredmények értékelése**

Az adatok kiértékeléséhez GraphPad InStat szoftver  $\chi^2$ , Welch-el korrigált páratlan t-próbáját, Mann-Whitney tesztjét, Fisher tesztjét és ANOVA analízisét használtuk. A 0,05-nél kisebb p érték esetén a különbséget szignifikánsnak vettük.



### 3. EREDMÉNYEK

#### 3.1. A különböző tényezők együttes hatása az *in vitro* maturációra

Munkám során vágóhídi petefészekből *in vitro* maturációval állítottunk elő érett petesejteket. Az *in vitro* maturációs rendszer paramétereit, úgymint a **szállítási hőmérséklet**, az *in vitro* **maturációs médium-összetétel** és az **inkubációs hőmérséklet** hatásait vizsgáltuk. A petefészkeket 32°C illetve 37°C-on szállítottuk melyek közül, a maturációs ráta értékét figyelembe véve, az alacsonyabb hőmérsékleten történő petefészek szállítás bizonyult hatékonyabbnak. A különböző inkubációs hőmérsékleten érlelődött petesejtek csak akkor mutattak szignifikáns különbséget maturációs rátájukban, ha a petefészek szállítása 37°C-on történt, ilyenkor a 38,5°C-on történő inkubáció mutatkozott eredményesebbnek. A két különböző IVM médiumban érlelt petesejtek maturációs eredményei nem mutattak szignifikáns különbséget.

#### 3.2. Különböző maturációs médiumok hatása a petesejtérésre és a későbbi embriófejlődésre

A négy különböző összetételű IVM médium alkalmazásakor az *in vitro* érlelést követően a maturációs ráta eredményeiben nem mutatkozott szignifikáns különbség a vizsgált csoportok között. Parthenogenetikus aktiválást követően a 20% FCS kiegészítést tartalmazó maturációs médiumban érlelődött petesejtek kevésbé voltak aktiválhatóak, mint a 10% FCS-t, illetve hormont és növekedési faktort tartalmazó médiumokban érlelődött petesejt csoportok, de még utóbbiak aktiválhatósága is alul maradt a kiegészítés nélküli csoporthoz képest. Az összes IVM petesejt aktiválhatósága alacsonyabb volt, mint az *in vivo* maturálódott kontroll csoporté.

A korai embriófejlődés tekintetében a kiegészítést nem tartalmazó maturációs csoport mutatta a szignifikánsan legalacsonyabb blasztociszta százalékot. A többi *in vitro* maturálódott csoport blasztociszta százaléka ennél magasabbnak bizonyult, de nem érte el az *in vivo* csoportra jellemző értéket.

### **3.3. Az *in vitro* maturáció dinamikája**

Vizsgálataink során a maturáció kezdetétől számított 3 órán belül egyik médium esetében sem találtunk érett, azaz MII-es stádiumú petesejtet. A két kísérleti csoport között a hatodik óráig nem tapasztaltunk eltérést a maturálódott petesejtek arányát illetően. A maturáció 9. és 12. órájában azonban szignifikánsan több érett petesejt volt jelen a 10%FCS-t tartalmazó maturációs oldatban, mint a 20% FCS tartalmúban. Az érés ezt követő időszakában nem tapasztaltunk további különbségeket a maturációs rátában.

### **3.4. A TSA-val kezelt klónozott embriók *in vitro* és *in vivo* fejlődése**

A testi sejtmag-átültetéses kísérletek során egy hiszton deacetiláz gátló anyaggal, TSA-val kezeltünk a klónozott nyúl embriókat és nyomon követtük *in vitro* illetve *in vivo* fejlődésüket. *In vitro* eredményeink azt mutatták, hogy a TSA-kezelés nem befolyásolta a hólyagsíra állapotú SCNT embriók arányát és sejtszámát sem. *In vivo* megfigyeléseink is hasonló eredményeket mutattak, nem találtunk eltérést a vemhességi és a születési arányok tekintetében. A klónozott utódok születési testtömege és placenta mérete azonban a TSA-kezelés nélküli csoportban szignifikánsan nagyobbak bizonyult.

### **3.5. Klónozott nyúlfiókák posztnatális fejlődése**

A két csoport posztnatális fejlődésének üteme nem tért el egymástól, viszont a TSA-kezelés hatást gyakorolt az élettartamra, ugyanis egyetlen kezelt egyed sem élte meg az ivarérett kort, míg a kontroll klónozott csoport esetében hat egyedből négy legalább 11 hónapig túlélte.

### **3.5. A Parthenogenetikus ko-transzfer hatása**

Egy-egy transzfer alkalmával 3-4 parthenogenetikus embriót ültettünk a 25-30 klónozott mellé. Az általunk mért összes mutató tekintetében (vemhesülési ráta, összes újszülött aránya, élő utódok aránya) jobb eredményeket kaptunk, ha a klónozott embriók mellé parthenogenetikus embriók is kerültek. Mindkét csoport esetén születtek élő utódok és a ko-transzfer ténye nem befolyásolta a későbbi egyedfejlődést. A ko-transzfer esetén az eredmények jobbak voltak, de az alacsony egyedszám miatt ez a pozitív hatás statisztikailag nem volt alátámasztható.

### **3.6. Két mélyhűtési technika összehasonlítása**

Mélyhűtési kísérleteink során *in vivo* nyúlembriókat vitrifikáltunk két különböző mélyhűtési technika alkalmazásával (VS3a vs. SSV). Az egyik módszernél (VS3a) műszalmában, míg a másikonál (SSV) apró médiumcseppekben történt a vitrifikáció. A két mélyhűtési eljárás során használt védőanyagok (CPA) toxikus hatásának vizsgálatokor a VS3a oldat esetében a túlélési, osztódás és morula arány alacsonyabbnak bizonyult a kontrollhoz képest, de a blasztociszták arányában ez a különbség statisztikailag nem volt igazolható. A két vitrifikációs eljárás metodikájának összehasonlításában (műszalma vs. apró térfogatban való vitrifikálás) a túlélési és osztódási arány egyforma mértékben volt gyengébb a kontrollhoz viszonyítva, a későbbi embrió fejlődés során azonban különbséget tapasztaltunk a két eljárás okozta hatások között, ugyanis a VS3a csoportban a blasztociszta arány (9%) jóval alacsonyabbnak bizonyult az SSV csoportéhoz képest (43%).

### **3.7. Az *in vitro* és *in vivo* nyúlzigóták mélyhűtésének összehasonlítása**

Az előző kísérletsorozatban kíméletesebbnek talált módszerünket (SSV) *in vitro* előállított zigótákon is kipróbáltuk és hasonlóan jó embriófejlődési eredményeket sikerült elérnünk (36%). Különbséget csak az *in vitro* termékenyült embriók toxicitási kontroll csoportjának alacsonyabb blasztociszta sejtszámában tapasztaltunk, amely az *in vitro* embriók krioprotektánsokkal szembeni nagyobb érzékenységére utal.

#### 4. ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK

1. Kifejlesztettem egy jól definiált *in vitro* maturációs oldatot, amelyben a nyúl petesejtek 89%-a érte el az MII stádiumot, parthenogenetikus aktiválás után 82%-uk osztódásnak indult és 22,7%-a blasztocisztává fejlődött.
2. Megállapítottam, hogy a nyúl petesejtek *in vitro* körülmények közt lezajló maturációja során eltérő érési dinamikát mutatnak 10 illetve 20%-os FCS tartalom mellett, ami hatást gyakorol a későbbi *in vitro* fejlődésre.
3. A világon elsőként alkalmaztam az SSV, illetve a VS3a vitrifikációs eljárásokat sikeresen nyúl zigóták mélyhűtésére.
4. Megállapítottam, hogy az *in vitro* termékenyült zigóták az *in vivo* termékenyültekkel megegyezően jó hatékonysággal mélyhűthetők az SSV technika alkalmazásával.
5. Laparoszkopos technika alkalmazásával klónozott nyúl embriókat ültettem be és sikerült élő utódokat előállítanom a Magyarországon elsőként végrehajtott sikeres nyúl felnőtt testi sejtmag-átültetési kísérletek során.

## 5. EREDMÉNYEK MEGBESZÉLÉSE ÉS JAVASLATOK

Számos publikáció számol be *in vitro* maturáltatott nyúl petesejtek használatáról, ám sokszor annak körülményeit igen homályosan írják le. Sok esetben hormon kezelt, laboratóriumi állatokat használnak petefészek donornak, amely állatok petefészke nem ekvivalens egy hormon kezelés nélküli vágóhídi állat ováriumával. A vágásra szánt állatok nagy százaléka reprodukciós problémák miatt kerül leselejtezésre, ezért is kihívás ezen állatok ováriumának használata. Az első kísérletsorozatban az *in vitro* maturációs rendszer paramétereit optimalizáltuk. A petefészkek szállítási hőmérsékletét 32°C, illetve 37°C-ra állítottuk be, melyek közül, a maturációs ráta nagyságát figyelembe véve, az alacsonyabb hőmérsékleten történő petefészkek szállítás bizonyult hatékonyabbnak. Ezalapján megállapíthatjuk, hogy az ováriumok közel testhőmérsékleten való szállítása során a petesejtek nagyobb mértékben károsodtak, mint alacsonyabb hőmérsékleten. Mindez azzal magyarázható, hogy a hosszabb (1-2 órás), közel testhőmérsékleten való tárolás elősegíti a különböző destruktív enzimátikus folyamatokat az ováriumokban.

A petesejt érése egy összetett folyamat, a nukleáris érés mellett a citoplazmatikus érésnek is meg kell történnie, hogy a sejt a teljes funkcióját be tudja tölteni. Ezért a második kísérletsorozatban a petesejtek egy részét parthenogenetikusan aktiváltuk, hogy a nukleáris érés mellett megfigyelhessük azok fejlődési képességét is. Azért választottuk a parthenogenetikus aktiválást és nem az IVF-et, hogy ezzel is csökkentsük a kísérletek ismétlésekor felmerülő spermaminőségbeli különbségek által okozott eltéréseket. Aktiválhatóság tekintetében eltéréseket tapasztaltunk a különböző maturációs médiumok között. Az embriófejlődést vizsgálva a kiegészítést nem tartalmazó IVM csoport gyengébbnek mutatkozott a többi *in vitro* csoporthoz képest. Ez azzal magyarázható, hogy bár a nukleáris érés sikeresen végbement, azonban az elégtelen, vagy részleges citoplazmatikus érés a későbbi embriófejlődésben zavart okozott. A hormon és növekedési faktor kiegészítéseket tartalmazó IVM médium használatakor hasonló embriófejlődési eredményeket értünk el, mint az FCS kiegészítéssel. Ez azért kedvező, mert így lehetőség nyílt arra, hogy egy jól definiált médiummal ugyanolyan hatékonyságot biztosítsunk, mint az ismeretlen összetételű szérummal.

A petesejt aktiválhatóságát számos tényező befolyásolja, és nagy jelentőséggel bír a sejt érésének időbelisége is. A 10%FCS-t tartalmazó oldatban a sejtek legnagyobb része már a maturáció 9. órájára elérte az MII-es stádiumot, míg ez a 20%FCS-es csoportban csak a 15. órára volt tehető. A hamarabb megérett petesejtekben már elkezdődhetnek az öregedési

folyamatok, amikor a sejtek aktiválásra kerültek (16h), ezért könnyebben is aktiválódtak, mint a 20%FCS tartalmú csoportban vizsgált petesejtek.

A testi sejtmag-átültetéses (SCNT) munkáink során különböző kezelések klónozott nyúl embriókra gyakorolt *in vitro* és *in vivo* hatásait vizsgáltuk meg a technológia hatékonyságának fejlesztése céljából. Az első kísérletsorozat alatt egy hiszton deacetiláz gátló anyaggal, Trichostatin A-val (TSA) kezeltünk a klónozott nyúl zigótákat és tanulmányoztuk *in vitro* valamint *in vivo* fejlődésüket.

*In vitro* eredményeink azt mutatták, hogy a TSA kezelés nem növeli a hólyagsíra állapotú SCNT nyúl embriók arányát, illetve sejtszámát a kezeletlen csoporthoz képest. Ez a megfigyelés összhangban áll mások által is publikált adatokkal. Az irodalomban azonban egymásnak ellentmondó eredményeket találni, amelyek a különböző TSA kezelési idővel és koncentrációval magyarázhatóak, valamint a klónozási protokoll eltéréseiből, a donorsejt típusának és embrió tenyésztés körülményeinek különbözőségeiből adódhatnak. Hasonlóan ellentmondásos megfigyelésekről számoltak be szarvasmarha esetében is. Mindez arra utal, hogy a TSA-kezelés hatása az SCNT embriók *in vitro* fejlődésére speciális kísérleti környezettel van összefüggésben és a kezelési feltételek további optimalizálása szükséges.

Kísérleteink során a TSA-val kezelt és kezeletlen SCNT nyúl embriók *in vivo* fejlődését is tanulmányoztuk. Eredményeink azt mutatták, hogy nincs különbség a vemhességi és a születési arány között a TSA-val kezelt és kezeletlen csoportok között, és mindkét csoportban sikerült élő utódokat nyernünk. Különbséget az élettartamban tapasztaltunk a két csoport között, ugyanis TSA-val kezelt embrióból származó klónozott utódok maximum 19 napig éltek, míg a TSA kezelés nélküli csoportban négy klón maradt életben a hatból és érte el az ivarérett kort. Ennek megértése és magyarázata még további kísérleteket igényel.

Kísérleteinkben a klónozott utódok születési testtömege és placenta mérete a TSA kezelés nélküli csoportban szignifikánsan nagyobb volt. Klónozott állatok esetében gyakran előfordul az úgynevezett óriási utód szindróma (LOS, large offspring syndrome), amely megnövekedett szervekben, vízfejségben és légzőszervi rendellenességekben nyilvánul meg. Sok esetben a placenta is megnövekszik és ödémás, ami a klónozásból adódó hibák kompenzációjaként jöhet létre. Esetünkben egyértelműen nem lehetett megállapítani a TSA kezelés hatását, mert az egy anyától született utódok száma nagyban eltért egymástól, ami önmagában is okozhatja a magzatok testtömegének eltérését.

Kísérleteink során, nyomon követtük a legalább 19 napig életben maradt utódok testtömeggyarapodását is, a TSA-val kezelt és a kezeletlen csoportokban egyaránt. Az első napi fogyástól eltekintve az összes kisnyúl testtömege nőtt az idő előrehaladtával. Az első kilenc

nap alatt mindkét csoportban volt átlag alatti egyed. Ezek alapján a TSA kezeléssel átesett csoport tagjai nem a testtömeg gyarapodásukban szenvedtek hiányt és nem emiatt pusztultak el, tehát nem a kezdeti alacsonyabb testtömeg volt az akadályozó tényező a túlélésben és a későbbi egyedfejlődésben.

A második kísérletsorozatunkban klónozott embriók mellé parthenogenetikus (PGA) embriókat is ültettünk (ko-transzfer) a recipiensekbe és ennek hatását vizsgáltuk a vemhesség megtartására, illetve a későbbi egyedfejlődésre. Korábbi publikációk szerint a PGA embriók együttes ültetése hasznos a beágyazódás és a vemhesség megtartásában a klónozott sertés és egér embriók esetében. A SCNT embriók *in vivo* fejlődésének parthenogenetikus embriókkal történő javítási mechanizmusa és az együttes ültetés jótékony hatásának pontos háttere még nem teljesen ismert. A természetes, *in vivo* fejlődésnél a vemhesség kialakulásához, illetve fenntartásához szükség van az embrióból és a magzatburkóból származó szignálokra, valamint egy kölcsönös, az embrió és az endometrium közötti kölcsönhatásra. Ellentétben a normál embriókkal, a parthenogenetikus nyúl magzat csak 10-11 napig képes fejlődni, ezáltal elkerülhető, hogy a beágyazódást követő későbbi fejlődés során kompetíció alakuljon ki a gyengébb klónok és a PGA magzatok között. Eredményeink alapján a vizsgált paraméterek - beleértve a vemhesség megtartását, a magzatképződést és az élve születést - jobbnak bizonyultak a ko-transzfer csoportban a kontroll SCNT csoporthoz viszonyítva, azonban a különbséget az alacsony mintaszám miatt statisztikailag nem lehetett megerősíteni.

Az embrió mélyhűtési kísérleteknél először két különböző vitrifikációs technikát hasonlítottunk össze. Első lépésként a mélyhűtés során használt védőanyagok (CPA) toxikus hatását vetettük össze. A VS3a oldat alkalmazásakor a túlélési, az osztódási és a morulák százalékos aránya alacsonyabb volt a kontrollhoz képest, de a blasztociszta aránynál tapasztalt különbség statisztikailag nem volt igazolható. Ebből arra lehet következtetni, hogy a VS3a-nál alkalmazott védőanyag koncentráció kis mértékben negatívan befolyásolja az embriók kezdeti növekedését, de ez a negatív hatás az embriófejlődés későbbi szakaszában már nem érvényesül, tehát a két vitrifikációs oldat hosszútávú hatása lényegesen nem különbözik egymástól. A két vitrifikációs eljárás összehasonlításakor (műszalma vs. kis térfogat) a túlélési és osztódási arány egyforma mértékben volt gyengébb a kontrollhoz képest jelezve, hogy mindkét mélyhűtési eljárás károsítja az embriókat, amelyeknek csak közel fele fejlődött tovább. A későbbi embriófejlődés során már mutatkozott különbség a két vitrifikációs technika között: a VS3a csoportban a blasztociszta arány jóval alacsonyabbnak bizonyult az SSV csoportban tapasztaltakhoz képest. Ebből arra következtethetünk, hogy a VS3a technika,

amelyben műszalmát használunk a hűtés során, kevésbé alkalmas a nyúl zigóták mélyhűtésére, a kis térfogatban történő SSV vitrifikáció kielégítőbb eredményeket hozott. Az irodalomban kevés nyúl zigóta mélyhűtésről szóló publikáció található és egy kivételtől eltekintve ezek is meglehetősen alacsony *in vitro* fejlődési adatokról számolnak be. Megállapíthatjuk, hogy az általunk alkalmazott eljárással megfelelő hatékonyságú mélyhűtési technikát sikerült beállítanunk. Módszerünket *in vitro* előállított zigótákon is kipróbáltuk (irodalomban erre nem található referencia) és hasonlóan jó eredményeket értünk el. Különbséget csak a blasztociszta sejtszámok esetében tapasztaltunk, amikor az *in vitro* termékenyült embriók toxicitási kontroll csoportjának hasonlóan lecsökkent a sejtszáma, mint a mélyhűtött-felolvasztott csoportban lévő embrióké. Az *in vivo* csoportban ez a különbség nem állt fenn, ez esetben a toxicitási kontroll csoportba tartozó embriók átlagos sejtszáma hasonlóan alakult a kontroll csoport embrióiéhoz. Ezek alapján elmondható, hogy az *in vitro* előállított embriók érzékenyebbek voltak a mélyhűtés során alkalmazott CPA-ra, mint *in vivo* társaik, ami a toxicitási kontroll alacsonyabb blasztociszta sejtszámában mutatkozott meg.



## 6. AZ ÉRTEKEZÉS TÉMAKÖRÉHEZ KAPCSOLÓDÓ PUBLIKÁCIÓK

### Könyv fejezet

- Louis-Marie Houdebine and Jianglin Fan (2009) Rabbit Biotechnology: Rabbit Genomics, Transgenesis, Cloning and Models; Chapter 9, Rabbit Cloning: Dinnyes A., **Polgar Z.**, and Meng Q.; Springer Dordrecht Heidelberg London New York; ISBN 978-90-481-2226-4 e-ISBN 978-90-481-2227-1

### Nemzetközi lektorált szaklapokban megjelent közlemények

- Dinnyes A, Meng Q, **Polgar Z.**, Boonkusol D, Somfai T: (2006) Cryopreservation of mammalian embryos. *Acta Scientiae Veterinariae*. 34 (Suppl 1): 171-190
- **Polgar Z.** and Dinnyes A. (2008) Transfert nucléaire et cellules souches embryonnaires chez le lapin *Biofutur* 27/287 pp: 32-35. (IF:0.026)
- Meng Q., **Polgar Z.**, Jun L, Dinnyes A. (2009) Live Birth of Somatic Cell-Cloned Rabbits following Trichostatin A Treatment and Cotransfer of Parthenogenetic Embryos. *Cloning and Stem Cells*, 11(1): 203-208 (IF:2.692)

### Nemzetközi impakt faktoros konferencia kiadványokban megjelent absztraktok

- **Polgar Z.**, Somfai T., Angeli V., Dinnyes A. (2006) Effect of different factors on in vitro maturation of rabbit oocytes. *Reproduction in Domestic Animals*, 41(4):306 (IF.: 1.503) ESDAR oral presentation
- **Polgar Z.**, TSomfai., Angeli V., Tang XH., Ji W. and Dinnyes A. (2007) Effects of FCS, growth factor and hormone supplementation during in vitro maturation on Parthenogenetic activation and embryo development of follicular rabbit oocytes. *Reprod Fertil Dev* 19(1): 290-291 (IF.:2.805) IETS poster
- Meng Q., **Polgar Z.**, Liu J., and Dinnyes A. (2008) Effect of Trichostatine A treatment on the term development of somatic cell nuclear transfer rabbit embryos *Reprod. Fertil. Dev.* 20(1) 103(IF.: 2.439) IETS poster
- Varga E; **Polgar Z.**; Bodo S and Dinnyes A (2008) Increase of fertilization with frozen semen in laser-assisted rabbit IVF. *Reproduction in Domestic Animals*: 43: 138-139 Suppl. 3, (IF.:1.526) ICAR poster

- **Polgar Z.**, Boonkusol D., Varga E. and Dinnyes A. (2010) In vitro development of vitrified in vivo and in vitro fertilized pronuclear-stage rabbit embryos *Reproduction in Domestic Animals* 45:69 Sup3.(IF.:1.606) ESDAR poster

#### **Nemzetközi konferencia kiadványokban megjelent absztraktok, poszterek, előadások**

- **Polgar Z.**, Somfai T., Angeli V., Dinnyes A. (2006) Effect of different factors on in vitro maturation of rabbit oocytes. 13. Szaporodásbiológiai Találkozó, Budapest oral presentation
- **Polgar Z.** and Dinnyes A. (2011) Nuclear transfer technology in rabbits. Abstract book 49 p. 4th International Rabbit Biotechnology Meeting, Budapest oral presentation

#### **Hazai lektorált szaklapokban megjelent közlemények**

- Varga, E., **Polgar, Z.**, Bodo, S. és Dinnyes, A. (2009) Lézer asszisztált in vitro fertilizáció fagyasztott spermával nyúl modellben. *Magyar Állatorvosok Lapja* 131.évf. 2009/9, 562-565 (IF:0,642)

#### **Hazai konferencia kiadványokban megjelent absztraktok, poszterek, előadások**

- **Polgar Z.**, Somfai T., Angeli V., Dinnyes A (2006) Nyúl petesejtek in vitro maturálása. XII Ifjúsági Tudományos Fórum, Pannon Egyetem Georgikon Mezőgazdaságtudományi Kar, Keszthely 2006. április 20. előadás (CD kiadvány)
- **Polgar Z.**, Somfai T., Angeli V., Dinnyes A (2006) Nyúl petesejtek in vitro maturációja.18. Nyúltenyésztési Tudományos Nap, Kaposvár, előadás 2006. május 24 (kiadvány 97-100. oldal)
- **Polgár Z.**, Somfai T., Varga E., Savolainen K., Angeli V., Aladzity I., és. Dinnyés A. (2007) Különböző maturációs környezet hatása nyúl petesejtek érési dinamikájára. VII. Magyar Genetikai Kongresszus, XIV. Sejt- és Fejlődésbiológiai Napok, poszter
- Varga E, **Polgár Z.**, Bodó S. és Dinnyés A. (2009) Lézer asszisztált in vitro fertilizáció fagyasztott spermával nyúl modellben 15. Szaporodásbiológiai Találkozó, előadás

## 7. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

A dolgozatom elkészítéséhez szükséges kísérleteket a Mezőgazdasági Biotechnológiai Kutatóközpont Mikromanipulációs és Genetikai Újraprogramozási csoportjában végeztem.

Köszönöm Dr. Nagy Ferencnek az MBK volt igazgatójának, hogy lehetővé tette a dolgozatom elkészítését.

Köszönettel tartozom témavezetőmnek Dr. Dinnyés Andrásnak a hosszúra nyúlt munkám során nyújtott folyamatos és nélkülözhetetlen támogatásáért.

Szeretnék köszönetet mondani az Olívia Kft vezérigazgatójának, Meinrad Odermatt úrnak és Kerepeczki Zoltán beszerzési vezetőnek hogy vizsgálataimhoz biztosították a nyúlpetefészkeket.

Nagy köszönettel tartozom Dr. Somfai Tamásnak és Dr. Bodrogi Lillának a kezdetekkor nyújtott segítségükért. Hálával tartozom Dr. Qinggang Meng, Dr. Jun Liu és Dr. Xianghui Tang a klónozási kísérletekben nyújtott áldozatos munkájukért. Szeretném megköszönni Dr Duang Jai Boonkusol segítségét a krioprezervációs kísérletekben, valamint Angeli Vivien, Varga Eszter és Kaisa Savolainen munkáját az *in vitro* petesejt érleltetés során. Külön köszönetet szeretnék mondani Dr. Bősze Zsuzsannának a kezdeti embrió beültetéseknel nyújtott segítségéért. Szeretném továbbá megköszönni a kutató csoport többi tagjának: Dr. Bodó Szilárdnak, Dr. Kobolák Juliannának, Dr. Solomon Mamonak, Dr. Adorján Mártának, Kungl Györgyinek, Serbana Getanak, Marótiné Nardai Dorottyának és Marinka Baláznak munkám során nyújtott segítségüket. Köszönöm az MBK munkatársainak, Dr. Bucsy László állatorvosnak, Lengyel Lászlóné, Basa Judit és Fülöp László állatgondozóknak a kísérleteim során használt állatok gondozásában nyújtott segítségüket.

Köszönöm Dr. Fehér Anitának, hogy segített a dolgozatom összeállításában és átnézésében.

Külön köszönettel tartozom szüleimnek és családomnak, akik végig mellettem álltak és bíztak abban, hogy eljutok ideig.

Munkám anyagi fedezetét a Teamoholic (MEXT-2003-509582), MED-RAT (LSHG-CT-2006-518240), CLONET (MRTN-CT-2006-035468), Wellcome Trust (Grant No.070246), Kínai-Magyar Bilaterális Project (TET CHN-28/04, CHN-41/05) RabPStem (PERG07-GA-2010-268422) pályázatok biztosították.