



## Az embrió minőségének hatása az embrió-átültetés eredményességére üzemi körülmények között

Szabari<sup>1</sup> M., Pinnyey<sup>2</sup> Sz., Boros<sup>3</sup> N., Sebestyén<sup>1</sup> J., Retter<sup>4</sup> Z.

<sup>1</sup>Kaposvári Egyetem, Állattudományi Kar, 7400 Kaposvár, Guba S. u. 40.

<sup>2</sup>Szegedi Tudományegyetem Mezőgazdasági Főiskolai Kar, 6800 Hódmezővásárhely, Andrassy u. 15.

<sup>3</sup>Nyugat-Magyarországi Egyetem, Mezőgazdaság- és Élelmiszertudományi Kar, 9200 Mosonmagyaróvár, Vár u. 2.

<sup>4</sup>Alcsiszigeti Mg. Rt. 5000 Szolnok, Keszeg u. 2.

### ÖSSZEFOGLALÁS

*A szerzők egy az embrió-átültetést rutinszerűen alkalmazó gazdaságban a felhasznált holstein-fríz embriók (n=925) morfológiáját osztályozták fénymikroszkóppal. Összefüggést kerestek az embriók morfológiai minősége, a mélyhűtés és az embrió-átültetés eredményesség között. Az in vivo holstein-fríz embriók frissen vagy etilén-glikolban fagyasztva kerültek beültetésre. Az embriók morfológiai jellemzői statisztikailag igazolható összefüggésben voltak a fagyasztott és a friss állapotban történő beültetés eredményességére.*

(Kulcsszavak: holstein-fríz, üzemi körülmény, embrió-átültetés, fagyasztás, embrió-minőség)

### ABSTRACT

#### Influence of the embryo quality for the efficiency of the embryo-transfer in field condition

M. Szabari<sup>1</sup>, Sz. Pinnyey<sup>2</sup>, N. Boros<sup>3</sup>, J. Sebestyén<sup>1</sup>, Z. Retter<sup>4</sup>

<sup>1</sup>University of Kaposvár, Faculty of Animal Science, H-7400, Kaposvár, Guba Sándor u. 40.

<sup>2</sup>University of Szeged, College of Agriculture, H-6800 Hódmezővásárhely, Andrassy u. 15.

<sup>3</sup>The University of West Hungary, Faculty of Agricultural Science, H-9200, Mosonmagyaróvár, Vár u. 2.

<sup>4</sup>Alcsiszigeti Agricultural Corporation, H-5000, Szolnok, Keszeg u. 2.

*The authors categorized the embryos of Holstein Friesian (n=925) from the morphologies with stereomicroscope in field conditions. The morulae and blastocysts were classified and examined, and further on the influence of the embryo quality for the efficiency of the embryo-transfer. The embryos were collected in vivo, transferred in fresh and frozen state. Embryos were frozen by controlled freezing methods using ethylene glycol. Results of the present study show that the qualities of the embryos were influenced for the efficiency of the embryo-transfer.*

(Keywords: Holstein Friesian, field conditions, embryo transfer, freezing, embryo quality)

### BEVEZETÉS

A szarvasmarha fajban a biotechnikai eljárások jelentős fejlődésen mentek keresztül az elmúlt 25-30 évben. Hazánkban embrió-átültetésből az első borjú 1978-ban született meg, majd 1983-ban fagyasztott embrióval az első sikeres transzfert is végrehajtották (Cseh és Dohy, 2003). Az embrió-átültetésnek és a hozzá kapcsolódó egyéb biotechnikai módszereknek az alkalmazása a szarvasmarha-tenyésztésben, növelte a legjobb genotípusú egyedek számát (Galli és mtsai., 2003). Az élő sejtek mélyhűtési technológiájának kidolgozása forradalmasította az állattenyésztésben használatos biotechnikai módszereket, új eszközt adván az állattenyésztők kezébe.

Szarvasmarha-embrióknál az embrió-átültetés megkövetelte fejlődési stádium a morula és blasztociszta állapot. Az embriómélyhűtésére is ekkor szokott sor kerülni. Az embriók minőségében azonban nagyfokú eltérés mutatkozik.

Az embriók beültetésének hatékonyságát az átültethető embriók fejlettsége mellett, többek között, az embriók minősége is befolyásolja (Hasler, 2001). Az embrióminőség meghatározásának legegyszerűbb vitális módja a morfológiai alapon történő osztályozás. A morfológiai bírálat előnye, hogy egyszerű, olcsó, gyors és a vizsgált embriók életképességét nem csökkenti. Jól végrehajtható – az embrió-átültetés során használt – fénymikroszkóp segítségével. Az embrió-átültetés gyakorlati végrehajtásakor ez a legelterjedtebb módszer és a hazai hivatalos dokumentálási forma is megköveteli ennek használatát.

A módszer tudományos megalapozását szolgáló vizsgálatokban az embriókat alkotó sejtek citoplazmájának és sejteinek elektro-denzitás vizsgálatával minősítettek morulákat és a blasztocisztákat és korrelációt találtak az egyszerű fénymikroszkóp alatt végzett morfológiai minősítés között (Abe és *mtsai.*, 1999). A legtöbb embrióminősítési vizsgálat, az embriókat körülvevő környezet elemzésén alapul. Vizsgálták a fagyasztást követő túlélési arányt is *in vivo* és *in vitro* körülmények között előállított embriókon Havlicek és *mtsai.* (2005). A tápfolyadékoknak az embrióminőségre gyakorolt hatását Lonergan és *mtsai.*, (2001) vizsgálták

A morfológiai alapon történő életképesség-becslés a gyakorlati tapasztalatok alapján szoros korrelációban van az embriók abszolút életképességével. Ezt igazolják a morfológiai alapon minősített embriók átültetéséből származó adatok is (Tervit és *mtsai.*, 1980; Schneider és *mtsai.*, 1980). A morfológiai minősítés alapján becsülhető a beültetés eredménye. Az *in vivo* nyert minősített embriók beültetésének eredményessége között Lindner és Wright (1983) is talált különbséget. A módszer hátránya viszont a nagyfokú szubjektivitás (Callesen és *mtsai.*, 1995). Az embriók életképességének végső ellenőrzésére a gyakorlatban a vemhességi diagnózis illetve a megszületett borjak száma adja a legmegbízhatóbb adatokat.

## ANYAG ÉS MÓDSZER

A vizsgálatokat egy magyarországi szakosított tejtermelő telepen végeztük, ahol 10 éve folytatnak üzemi körülmények között embrió-átültetést. Az állomány fajtája holsteinfρίζ. Az embriók kimosását és a beültetését az istállókban végeztük. A donor és recipiens állatok nem részesültek különleges, egyedi takarmányozásban.

A tehenek szuperovulátását FSH-val (OVAGEN, ICPbio) végeztük, az ivari ciklusuk luteális fázisának a közepén. A szuperovulátott tehenekből a termékenyítést követő 7. napon, vértelen módon nyert morula és blasztociszta embriókat hatvanszoros nagyításban, fénymikroszkóp (60X) alatt minősítettük.

A rutinszerű munka során az embriók minőségét 4 osztályba soroltuk Lehn-Jensen (1986) munkája alapján. Ezek meghatározása erősen szubjektív, hiszen nagymértékben a technikus személyéhez köthető. Az első osztályba a kiváló minőségű embriók kerültek, melyeket egyforma méretű és homogenitású sejtek alkottak és tiszta perivitális térrel, gömbölyű és ép zona pellucidával rendelkeztek. Ezek az embriók hibátlan sejtstruktúrájúk, szoros sejtkezeléssel bírtak.

Másodosztályú minősítést kaptak, az előző osztályba tartozó embriókhoz hasonló sejtstruktúrájúk, ha már apró törmelékdarabok találhatóak a perivitális térben. A blasztomerekben apró üregek megengedettek. Összességében ezek az embriók csekély mértékben tértek el az első osztálytól.

A harmadosztályba sorolt embriók jelentősen különböznek az előző osztálytól. A sejtek nagy része sérült, nagyobb sejt darabok találhatóak a perivitális térben.

A negyedik minőségi osztályba az ún. „degenerált” embriók tartoztak. Sejtszerkezetük laza, tisztán kivehető degeneratív elváltozások tapasztalhatóak a blasztomerekben, sok nagydarab sejt törmelék található a zóna pellucidán belül és a sejteknek kevesebb, mint a fele ép. Szubjektivitás szempontjából az első és az utolsó csoportnak a legegységesebb a megítélése. Az embrió-átültetési munka komplex folyamata során ezeket a fejlettségi kategóriákat és minőségi osztályokat használtuk és ezek alapján történik a hatóság felé a hivatalos dokumentáció is.

Az embriókat egyedileg, mikropipetta segítségével 0,25 ml-es műszalmába töltöttük. A műszalmázott embriók szükség szerinti fagyasztása etilén-glikolban történt (Voelkel és Hu, 1992; Hasler és mtsai., 1997; Dochi és mtsai., 1998; Martinez és mtsai., 2002; Hasler, 2003), programozható fagyasztóval (EUROTHERM). A műszalmákat előhűtött fagyasztóba helyeztük be. A kristályosodás indukálása (seeding)  $-7^{\circ}\text{C}$ -on történt, a hűtési sebesség  $0.3^{\circ}\text{C}/\text{min}$  volt  $-30^{\circ}\text{C}$ -ig. Ezt követően a műszalmákat folyékony nitrogénbe helyeztük (Dochi és mtsai., 1998). A fagyasztott műszalmák felolvasztása  $37^{\circ}\text{C}$ -os vízfürdőben történt 12 másodpercig. Ezt követte vértelen úton, a beültetésük. A friss ( $n=517$ ) és a fagyasztott ( $n=408$ ) embriókat közvetlen módon ültettük be, szinkronizált recipiensekbe. A recipiensek szinkronizálását proszttaglandinnal (ESTRUMATE) végeztük. Az átültetés eredményességét rektális úton, manuálisan ellenőriztük a beültetéstől számított 50–60. napon.

Az adatok statisztikai értékelését  $\text{Chi}^2$  próbával végeztük, melyhez SPSS 11.5 statisztikai programcsomagot használtunk.

## EREDMÉNY ÉS ÉRTÉKELÉS

Megpróbálván kiküszöbölni a minősítés során fellépő szubjektivitást, az értékelés során a bemutatott, minőségi osztályok egy részét összevontuk. Általunk adott „jó” minősítést csak az I. osztályba tartozó embriók kaptak ( $n=654$ ). A többi (II-III-IV minőségi osztály) a „rossz” kategóriába esett ( $n=271$ ). A munkánk folyamán az embriók fejlettségét nem vettük figyelembe. A vemhesülési eredményeinket 100 beültetésre vonatkozóan, vemhesülési százalékban adtuk meg. A „jó” és a „rossz” minőségű embrióknak a friss állapotban történő beültetés eredményességére gyakorolt hatását az *I. ábra* mutatja be.

A „jó” embriók frissen történt beültetése során elért vemhesülési százalék szignifikánsan nagyobb ( $47\%$  vs  $32,1\%$ ;  $P<0,05$ ) mint a „rossz” embriók esetében. A „jó” minősítésű embrióval elért eredmény gyakorlati szempontból is elfogadhatónak mondható. A „rossz” minősítésű embriók átültetésekor megközelítőleg 3 ültetésből nyerhető egy utód.

A 2. ábrán a különböző minőségű fagyasztott embriók megtapadását mutatjuk a be.

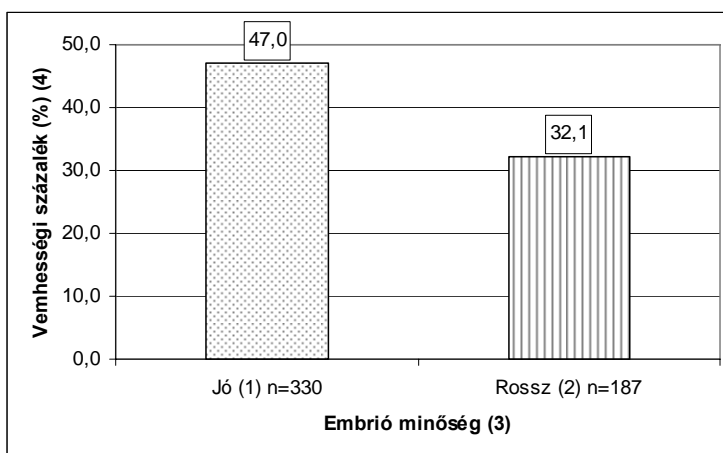
A „jó” embriók a vemhesülési százaléka szignifikánsan nagyobb arányú ( $21,3\%$  vs  $9,4\%$ ;  $P<0,05$ ) volt, mint a „rossz” embrióké. A fagyasztás, gyakorlati előnye mellett, a vitalitást gyengítő hatása egyértelműen jelentkezett. Mind a frissen, mind a fagyasztva történt átültetés után gyengébb eredményt kaptunk.

## KÖVETKEZTETÉSEK

Az eredmények alapján megállapítható, hogy az embrió morfológiai minősége szignifikáns ( $P<0,05$ ) hatással van a beültetés eredményességére. Ez a különbség fagyasztott és frissen felhasznált embriók esetében is igaz. A morfológiai vizsgálat alapján a várható vemhesülés jól becsülhető.

1. ábra

Az embrió minőségének a hatása a friss állapotban történő átültetés eredményére



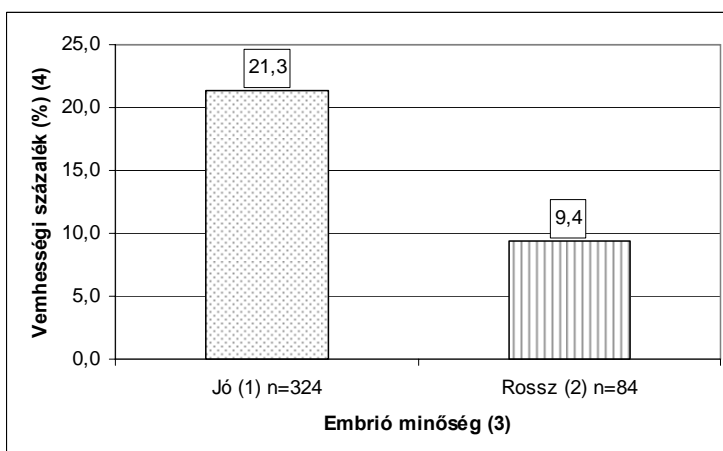
P<0.005

Figure 1. Effect of the embryo quality for the pregnancy in fresh state

Good (intact and spherical zona pellucida, homogeneous cell mass with cells of uniform size)(1), Bad (other)(2), Embryo quality(3), Pregnancy rate(4)

2. ábra

Az embrió minőségének a hatása a fagyasztott állapotban történő átültetés eredményére



P<0.005

Figure 2. Effect of the embryo quality for the pregnancy in frozen state

Good(1), Bad(2), Embryo quality(3), Pregnancy rate(4)

A jelenlegi recipiens árak mellett célszerű elvégezni az embriók fénymikroszkóppal történő előszelekcióját. Az így rendelkezésre álló embrió-minőségi adat után lehetőség van arra, hogy kellő megfontolás után, melyik embrió kerüljön friss állapotban történő beültetésre, illetve fagyasztásra, felvállalván a mélyhűtési eljárásnak az embrióra gyakorolt vitalitás csökkentő hatását.

A költséghatékonyság érdekében érdemes minél több recipiensről gondoskodni, hogy elkerülhető legyen a saját tenyészetben történő felhasználásra szánt, *in vivo* előállított embriók kényszerű fagyasztása. A továbbiakban ezért célszerű meghatározni, hogy milyen tényezők okozhatják ezeket a morfológiai elváltozásokat, hogy ezek kiküszöbölésével, növeljük a vemhesülési százalékot, ezáltal az eljárás eredményességét.

## IRODALOM

- Abe, H., Otoi, T., Tachikawa, S., Yamashita, S., Satoh, T., Hoshi, H. (1999). Fine structure of bovine morulae and blastocysts *in vivo* and *in vitro*. *Anat Embryol.*, 199. 6. 519-27.
- Cseh J., Dohy S. (2003). Asszisztált reprodukciós technikák (art) a hazai állattenyésztési gyakorlatban Történeti áttekintés. Állattenyésztés és Takarmányozás. 1. 3-15.
- Dochi, O., Yamamoto, Y., Saga, H., Yoshihara, N., Kano, N., Maeda, J., Miyata, K., Yamauchi, A., Tominaga, K., Oda, Y., Nakashima, T., Inohae, S. (1998). Direct transfer of bovine embryos frozen-thawed in presence of propylene glycol or ethylene glycol under on-farm conditions in an integrated embryo transfer program. *Theriogen.* 49. 5. 1051-58.
- Galli, C., Duchi, R., Crotti, G., Turini, P., Ponderato, N., Colleoni, S., Lagutina, I., Lazzari, G. (2003). Bovine embryo technologies. *Theriogen.* 59. 2. 599-616.
- Hasler, J.F. (2001). Factors affecting frozen and fresh embryo transfer pregnancy rates in cattle. *Theriogen.* 56. 9. 1401-15.
- Hasler, J.F. (2003). The current status and future of commercial embryo transfer in cattle. *Anim. Reprod. Sci.*, 79. 3-4. 245-264.
- Hasler, J.F., Hurtgen, P.J., Jin, Z.Q., Stokes, J.E. (1997). Survival of IVF-derived bovine embryos frozen in glycerol or ethylene glycol. *Theriogen.* 48. 563-579.
- Havlicek, V., Lopatarova, M., Cech, S., Dolezel, R., Huber, T., Pavlok, A., Brem, G., Besenfelder, U. (2005). *In vivo* culture of bovine embryos and quality assessment of *in vivo* vs. *in vitro* produced embryos. *Vet. Med. – Czech.*, 50. 4. 149-157.
- Lehn-Jensen, H. (1986). Cryopreservation of bovine embryos. Dr. Vet. Sci. Dissertation. Royal Vet. and Agri. Univ., Denmark.
- Lindner, G., Wright, R.W. (1983). Bovine embryo morphology and evaluation. *Theriogen.* 20. 407.
- Lonergan, P., Rizos, D., Ward, F., Boland, M.P. (2001). Factors influencing oocyte and embryo quality in cattle. *Reprod. Nutr. Dev.*, 41. 427-437.
- Martinez, A.G., Brogliatti, G.M., Valcarcel, de las Heras, A. (2002). Pregnancy rates after transfer of frozen bovine embryos: a field trial. *Theriogen.* 58. 5. 963-72.
- Schneider, H.J., Castleberry, R.S. Jr., Griffin, J.L. (1980). Commercial aspects of bovine embryo transfer. *Theriogen.* 13. 73-86.
- Tervit, H.R., Cooper, M.W., Goold, P.G. (1980). Non-surgical embryo transfer in cattle. *Theriogen.* 13. 1. 63-71.
- Voelkel, S.A., Hu, Y.X. (1992). Use of ethylene-glycol as a cryoprotectant for bovine embryos allowing direct transfer of frozen-thawed embryos to recipient females. *Theriogen.* 37. 3. 687-697.

Levelezési cím (*Corresponding author*):

**Szabari Miklós**

Kaposvári Egyetem, Állattudományi Kar  
Nagyállat-tenyésztési és Termelés-technológiai Tanszék

7400 Kaposvár, Guba Sándor u. 40.

*University of Kaposvár, Faculty of Animal Sciences*

*H-7401 Kaposvár, P.O.Box 16.*

Tel.: 36-82-314-155, Fax: 36-82-320-175

e-mail: [szabarim@mail.atk.u-kaposvar.hu](mailto:szabarim@mail.atk.u-kaposvar.hu)