

Szarvasmarha *in vitro* embrió-előállító rendszer létrehozása kutatási modellkísérletek számára – módszertani ismertető

Nagy Katalin^{1,2,3}  , Tokár Alexandra^{2,3}, Sándorová Lilla^{3,4}, Gócza Elen⁵ ,
Zomborszky Zoltán⁶, Stéger Viktor⁴ , Szabari Miklós² ,
Póti Péter¹, Bodó Szilárd^{2,3} 

¹Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem, Állattenyésztési Tudományok Intézet, Állattenyésztés-technológiai és Állatjóléti Tanszék, 2100 Gödöllő, Páter Károly u. 1.

²Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem, Állattenyésztési Tudományok Intézet, Precíziós Állattenyésztési és Állattenyésztési Biotechnika Tanszék, 7400 Kaposvár, Guba Sándor u. 40.

³Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem, Szaporodásbiológiai, Embriológiai és Génmegőrzési Kutatócsoport, 2100 Gödöllő, Páter Károly u. 1.

⁴Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem, Genetika és Biotechnológia Intézet, Genetika és Genomika Tanszék, 2100 Gödöllő, Szent-Györgyi Albert u. 4.

⁵Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem, Genetika és Biotechnológia Intézet, Állatbiotechnológia Tanszék, 2100 Gödöllő, Szent-Györgyi Albert utca 4.

⁶9-élet Állatorvosi Rendelő, 7400 Kaposvár, Németh István fasor 56.

Received/Érkezett: 15. 11. 2024.

Accepted/Elfogadva: 10. 02. 2025.

Összefoglalás: Az *in vitro* embrió-előállítás (IVEP) 40 éves töretlen fejlődésének köszönhetően napjainkra egyre fontosabb szerepet tölt be a világ szarvasmarha-tenyésztésében. A petesejtek kinyerése, laboratóriumi körülmények között történő termékenyítése, az embriók tenyésztése, a krioprezerváció, illetve a laboratóriumi környezet terén elért fejlődés több millió genetikailag magas értékű egyed előállítását tette lehetővé. Gyakorlati alkalmazási lehetőségei mellett az *in vitro* embrió-előállítás (IVEP) számos kutatás alapját biztosítja. Segítségével a korai vemhességi időszak modellezhető, az embriófejlődés környezeti tényezői tanulmányozhatók, így olyan kérdésekre kaphatunk választ, melyek a tudományos és gyakorlati szakemberek számára is fontosak. Egy megbízhatóan működő embrió előállító rendszer kialakítása során sok technológiai lépés optimalizálására van szükség. Az elmúlt év során a szerzőknek sikerült kialakítaniuk egy olyan, jól működő rendszert, melyben sikeresen folyik a szarvasmarha embriók előállítása, így oktatási, kutatási feladatok megvalósítására alkalmas. A közleményben a szerzők bemutatják a rendszer kialakítását egészen a kezdetektől, ennek sikereit és buktatóit egyaránt, valamint beszámolnak az itt végzett 31 IVEP program eredményességéről. A kialakított rendszerben átlagosan a termékenyített petesejtek 69%-a osztódik, és 23,4%-a fejlődik beültethető állapotú hólyagcsíráig, így alkalmas ovum pick-up (OPU) IVEP programok megvalósítására is.

Kulcsszavak: szarvasmarha, *in vitro* embrió-előállítás, *in vitro* modellrendszer

Establishment of a bovine *in vitro* embryo production system for research model experiments – methodology

Katalin Nagy^{1,2,3}  , Alexandra Tokár^{2,3}, Lilla Sándorová^{3,4}, Elen Gócza⁵ ,
Zoltán Zomborszky⁶, Viktor Stéger⁴ , Miklós Szabari² ,
Péter Póti¹, Szilárd Bodó^{2,3} 

¹Hungarian University of Agriculture and Life Sciences, Institute of Animal Sciences,
Department of Animal Husbandry and Animal Welfare, 2100 Gödöllő, Páter Károly 1.

²Hungarian University of Agriculture and Life Sciences, Institute of Animal Sciences,
Department of Precision Livestock Farming and Animal Biotechnics,
7400 Kaposvár, Guba Sándor 40.

³Hungarian University of Agriculture and Life Sciences, Reproduction, Embryology and
Gene Conservation Research Group, 2100 Gödöllő, Páter Károly 1.

⁴Hungarian University of Agriculture and Life Sciences, Institut of Genetics and Biotechnology,
Department of Genetics and Genomics, 2100 Gödöllő, Szent-Györgyi 4.

⁵Hungarian University of Agriculture and Life Sciences, Institut of Genetics and Biotechnology,
Department of Animal Biotechnology, 2100 Gödöllő, Szent-Györgyi 4.

⁶9-life Veterinary Clinic, 7400 Kaposvár, Németh István 56.

Abstract: Thanks to 40 years of uninterrupted development, *in vitro* embryo production (IVEP) plays an increasingly important role in cattle breeding worldwide. Advances in oocyte retrieval, fertilisation in the laboratory, embryo culture, cryopreservation and the laboratory environment have enabled millions of genetically valuable embryos to be produced. In addition to its practical applications, *in vitro* embryo production (IVEP) provides a basic model environment for a wide range of research. It can be used to model the early gestation period and to study the environmental factors of embryo development, thus answering questions that concern both scientists and practitioners. The design of an embryo production system that delivers reliable results requires the optimisation of many technological steps. Over the past year, the authors have succeeded in developing a well-functioning system for successful bovine embryo production, making it suitable for educational and research purposes. In this communication, the authors describe the development of the system from its inception, its successes and difficulties, and report on the success of the 31 IVEP programmes. On average, 69% of fertilized oocytes cleave and 23.4% develop to an implantable blastocyst, making the system suitable for ovum pick-up (OPU) IVEP programmes.

Keywords: bovine, *in vitro* embryo production, *in vitro* model system

Az *in vitro* embrió-előállítás története, szerepe

Az első "lombik bébi" 46 évvel ezelőtt született. Az *in vitro* fertilizációs (IVF) technológiának más fajok, többek között szarvasmarha esetében is meghatározó szerepe van. Kezdetben az IVF technika kialakításának célja a szarvasmarhánál is hasonló volt, mint amiért azt emberek esetében kifejlesztették: a meddőség kezelése. Az infertilitást mutató állatoknál némi sikert értek el ugyan, de a későbbiekben a módszer fejlesztése és alkalmazása nagyrészt a genetikai szelekció javítására és a generációs intervallum csökkentésére irányult. A módszer gyakorlati alkalmazását 40 évnyi, főként vágóhidakról származó petefészkekből kinyert petesejtekkel és fagyasztott spermával végzett kutatás segítette elő. A tehenek esetében is igen hatékony eljárás jött létre a MOET alternatívájaként (Bousquet et al. 1999). Mivel az első sikeres humán IVF-hez vezető eljárás során érett petesejteket nyertek ki, a kezdeti erőfeszítések arra irányultak, hogy tehenekből is érett petesejteket nyerjenek laparotómiával, majd végül laparoszkópiával. A világ első IVF borját Benjamin Brackett csoportja hozta létre, a petesejtkinyerésre és az embriók petevezetőbe történő átültetésére műtéti eljárást alkalmaztak (Brackett és mtsai. 1982). További négy évbe telt mire kifejlesztették a petesejtek laparoszkópos kinyerését és a blasztociszták sebészi átültetését a méhbe hétnapos nyúl petevezetékben történő inkubációt követően (Sirard és Lambert 1986). Az első tíz évben a laparoszkópia maradt a preferált technika az IVEP klinikai alkalmazásában, melyet később az ultrahang segítségével végzett ovum pick-up technológia váltott fel. Az IVF kutatási célú felhasználásának robbanásszerű növekedése a vágóhidakról származó petefészkekből nyert petesejtek felhasználásának lehetőségéből adódott. Ezt Európában és az Egyesült Államokban több helyen, nagyjából egy időben fejlesztették ki, meglehetősen hasonló protokollokkal (Greve és Madison, 1991). Ennek köszönhetően jelentős előrelépés történt az ivarsejtek, illetve az embriók igényeinek és anyagcseréjének megértésében, ami lehetővé tette újabb médiumok kifejlesztését a magasabb blasztociszta arány és az embriók megfelelő minőségének elérése érdekében (Hansen, 2006). Meglepő módon az elsőként használt médiumok több, mint 30 éve ugyanazok maradtak. A legtöbb laboratórium még mindig Neal First laboratóriumában kifejlesztett TCM-199-et használja szérummal, FSH-val és ösztradiollal kiegészítve az *in vitro* petesejtérleléshez (Sirard et al. 1988), valamint a Tyrode-Lactate tartalmú médiumot a spermiumok mosásához és petesejtekkel történő koinkubációjához. Egészen más a helyzet az embriótenyésztő médium esetében, amelyet az első tíz évben többször módosítottak (Greve és Madison, 1991), és amelynek összetétele még napjainkban is változik (Sirard, 2018b). Az *in vitro* módon előállított embriók mélyhűthetők és lehetőség van embrióbiopszia segítségével az embriók genotipizálására és genomikai elemzésére is. Az IVEP optimalizálásába fektetett munka egy nagyon hatékony eljárást eredményezett, amely segítségével az *in vivo* embrió-előállítás alternatívájaként tud megjeleníteni a szelekció hatékonyságának növelésében. A petesejtek sikeres érlelése, ivardeterminált spermával történő termékenyítése, a meghatározott közegben történő embriótenyésztés, a preimplantációs genetikai diagnózis és a krioprezerváció lépéseinek összessége hozzájárult ahhoz, hogy az *in vitro* embrió-előállítás gazdasági jelentősége megnövekedett (Ferré et al., 2020; Sirard, 2018a).

Az IVEP szerepe a kutatásban, mint alkalmazott embriológiai modell rendszer

Az utóbbi időben egyre nagyobb érdeklődés mutatkozik a szarvasmarha preimplantációs embriológiai és a szarvasmarha, vagy kérődző *in vitro* modellek iránt a humán asszisztált

reprodukciós technikák és a termékenység megőrzésének mélyreható vizsgálataihoz (Adams et al., 2012; Menezo és Herubel, 2002). Ennek oka a szarvasmarha és az ember között fellelhető számos fiziológiai hasonlóság; például a follikulogenezis időtartama és mindkét faj egyet ovuláló, valamint a petesejtek lipiddartalma, az embriók anyagcseréje, a kromatin mintázatok és az embriók kinetikája is hasonlóságot mutat az emberrel a vizsgált fejlődési szakaszban (Halstead et al., 2020; Jiang, 2024; Sirard, 2017). Bittner et al. (2018) ilyen szarvasmarha *in vitro* modellkísérletben állapították meg, hogy az oxidatív stressz DNS-károsodást idéz elő a spermiumokban, mely az embriók minőségének romlásához és fejlődési rendellenességekhez vezethet. A stressz és reprodukciós kutatások mellett a különböző környezetszennyező anyagok reprodukcióra kifejtett hatásait is vizsgálni lehet szarvasmarha modell rendszerben, megfigyelve a kezelt petesejtek érését és a korai embriófejlődést *in vitro* körülmények között (Hallberg et al., 2019). A kérődzők *in vitro* modelljéhez a vágóhídról származó petefészkekből nyerhetők ki nagy mennyiségben a pre-antrális tüszők, az érett petesejteket magukba foglaló kumulusz-petesejt komplexek, így biztosítva a vizsgálatokhoz szükséges embrió-mennyiséget (Langbeen et al., 2015). A modellrendszer alkalmazása kritikus fontosságú, mert a humán embriók kísérleti felhasználása az emberi minták szűkössége és az etikai kérdések miatt korlátozott. (Sirard, 2017).

A különböző modellkísérletek nem csak humán vonatkozásban, hanem magában a szarvasmarhatenyésztésben is fontos szerepet töltenek be. A laboratóriumi körülmények között előállított szarvasmarha embriókat felhasználhatjuk a fejlődés szempontjából fontos szabályozási útvonalak megértéséhez. Az extracelluláris vezikulumok, mikroRNS-ek az embrió és környezete közötti kulcsfontosságú kétirányú hírvivőnek bizonyultak az implantáció előtti és utáni fejlődés különböző szakaszaiban (Lange-Consiglio et al., 2020). Az extracelluláris vezikulumok a blasztociszták fejlődése során keletkeznek és vizsgálatukkal az embrió stressz-állapota jellemezhető *in vitro* körülmények között, mivel alkalmasak az embrionális génexpresszió megváltozásának kimutatására (Lopera-Vasquez et al., 2017; Menjivar et al., 2023). Ezen túlmenően az embrió extracelluláris vezikulumai és mikroRNS-ei nem invazív diagnosztikai vizsgálatokra biztosítanak lehetőséget az adott embrió minőségének és életképességének megállapításához (Hawke et al., 2021). A meghosszabbított *in vitro* embriótenyésztés (Isaac et al., 2024) és a szintetikus embriómodellek (Pinzon-Arteaga et al., 2023) lehetővé teszik az embrióban a blasztociszta stádium után zajló élettani folyamatok feltárását, melynek vizsgálata *in vivo* módon nehézségekbe ütközik.

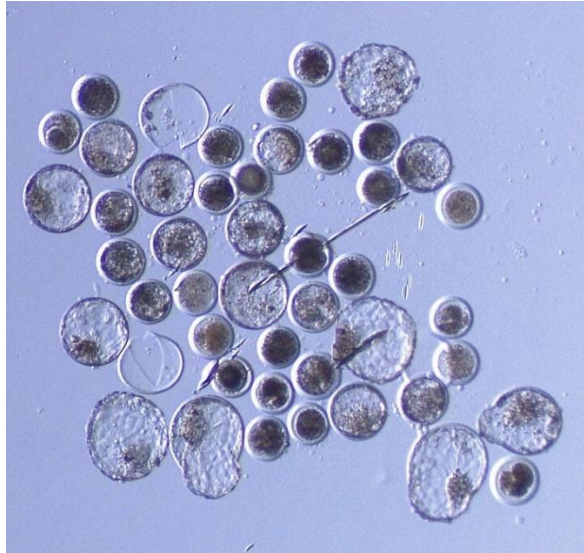
Az IVEP rendszer kialakítása – sikerek és buktatók

„Csupán egy dolog fontos igazán egy IVF laboratóriumban: minden” (Cairo Consensus Group, 2018) – a lehető legpontosabb megfogalmazás, mellyel minden *in vitro* embrió-előállítással foglalkozó szakember egyetért. A laboratórium kialakítása során számos szempontot figyelembe kellett vennünk annak érdekében, hogy az embrió-előállítást adottságainkhoz mérten a lehető leghatékonyabban tudjuk megvalósítani a Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem Állattenyésztési Tudományok Intézet (MATE ÁTI) és Genetika és Biotechnológia intézet (GBI) egyetemen belüli együttműködésének köszönhetően. A szükséges eszközöket próbáltuk oly módon kiválasztani, hogy a laboratóriumban minden megtalálható legyen, melyre az IVEP során szükségünk lehet. Ez biztosítja egy sztereó- és egy inverzmikroszkóppal felszerelt lamináris fülke, ezen kívül egy fűtőlappal felszerelt sztereomikroszkóp, egy CO₂, O₂ szintregulációt lehetővé tevő hatkamrás és egy egyterű

szén-dioxid inkubátor, egy mágneses keverő, egy centrifuga és egy csőmelegítő készülék. A laboratórium berendezése után következő lépésként beszerzésre kerültek a szükséges fogyóanyagok és eszközök, melyek elengedhetetlenek az embrió-előállítás során. A cseppfolyós nitrogént és az inkubátorok működtetéséhez szükséges szén-dioxid és nitrogén gázpalackokat a MATE által megkötött keretszerződések által szereztük be. Az *in vitro* embrió-előállításhoz IVF Bioscience (IVF Limited T/A IVF Bioscience, UK) médiumokat használunk. A szükséges előkészületek után 2023.10.18.-án kezdtük meg a tényleges munkát az elkészült laboratóriumban. A petefészkeket a ceglédi szarvasmarha vágóhídon saját magunk gyűjtöttük össze, azok nemi traktusból való kivágásával, majd Gödöllőre szállítottuk őket a további munkafolyamatok elvégzéséhez. A későbbiekben, 2024.02.22.-től a petefészkeket a gyöngyösi szarvasmarha vágóhíd bocsájtja rendelkezésünkre. A rendszer üzemeltetése nagyon érzékeny, szembesültünk azzal, hogy amennyiben a petefészek szállítás nem megfelelő, esetleg áramkimaradás történik, ez azonnal negatív eredményként jelenik meg. A munkafolyamatok betanulása idő-, anyag- és eszközigényes feladat. A laboratóriumban speciális feltételeket hozunk létre az egyes munkafolyamatok során, melyek a petesejtek termékenyítése és az embriók tenyésztése során eltérnek a rutin eljárásoktól (például denudált petesejtek termékenyítése, különböző hőmérséklet vagy gázkeverék alkalmazása), az így megváltoztatott körülmények kialakítása során sokszor tapasztaljuk az eredmények drasztikus romlását.

Eredményeink

Az elmúlt év során a laboratóriumban 31 IVEP programot valósítottunk meg. A kezdeti időszak magába foglalta a laboratóriumi eszközök és környezet optimalizálását, majd a későbbiekben szakdolgozatukat témavezetésünk alatt készítő hallgatóink betanulását az embrió-előállítás módszerébe. Eddigi munkánk során összesen 1791 darab vágóhídi petefészek-mintát dolgoztunk fel, melyekből 5506 darab petesejtet nyertünk ki. Összességében azon programokkal együttvéve, melyek külső tényezők miatt sikertelennek bizonyultak, a termékenyített petesejtek 65%-a osztódott, és 21,2%-uk érte el a blasztociszta stádiumot. Amennyiben ezeket a programokat nem jegyezzük, az arányok a következőképpen alakulnak: 69% osztódott zigóta 23,4% blasztociszta arány mellett. Illetve ha a hallgatók gyakorló programjait nem vesszük figyelembe, az átlagos osztódási százalék 74%, a blasztociszta arány pedig 28,9%. Ez az eredmény világszínvonalon elfogadhatónak mondható (20% blasztociszta arány 70% osztódási arány mellett) (Speckhart et al., 2023). A laboratórium működése során legjobb eredményünk 71%-os osztódás mellett 42% blasztociszta arány elérése volt, melyet többször is megközelítettük. Megállapítható tehát, hogy az egy éves munkánk eredményeként sikerült egy megbízható kísérleti modellrendszert létrehozunk, amin megkezdhetjük a kutatási munkát. Emellett a rendszer alkalmas OPU IVEP embriók létrehozására is, ami több kutatási pályázat megvalósítandó feladata. A kialakított *in vitro* embrió előállító technológiát kívánjuk alkalmazni a MATE ÁTI Hasonállat Biotechnológiai Oktatási és Kutatási Központjának embriológiai laboratóriumában is szarvasmarha esetében.



1. ábra. *In vitro* előállított szarvasmarha embriók az embrió-tenyésztés nyolcadik napján

Forrás/Source: Saját fotó (2024)

Figure 1 In vitro produced bovine embryos on the 8th day of embryo culture

A létrehozott IVEP rendszerben a következő kutatásokat tervezzük megvalósítani:

- tervezett időtartamú és hőmérsékletű hőkezelés a hőstressz-fehérjék expressziós szintjére gyakorolt hatásának és a kezelt embriók kriotoleranciájának vizsgálata,
- termékenyítő anyag *in vitro* funkcionális tesztek elvégzésére alkalmas IVF kísérleti rendszer összeállítása, amellyel hagyományos és automatizált spermaértékelési módszerek validálása válik lehetővé,
- preimplantációs genetikai diagnosztika fejlesztése A2 homozigóta és nőivarú embriók szelekciójához embriómélyhűtés és/vagy beültetés előtt,
- preimplantációs korú *in vitro* előállított embriók transzkriptomikai és proteomikai vizsgálata,
- intracitoplazmatikus spermium injektálás és embrióbiopszia mikromanipuláció kidolgozása,
- ovum pick up segítségével kinyert petesejtekből embriók létrehozása *in vitro*
- petesejt és embrió mélyhűtési technikák – programozott fagyasztás, vitrifikáció fejlesztése,
- mikrofluid embriótenyésztési technológia tesztelése,
- *in vitro* létrehozott embriók genomikus tenyésztékének meghatározásának fejlesztése,
- *in vitro* follikulogenezis vizsgálata,
- post mortem gaméta kinyerés után *in vitro* embriók létrehozása *ex situ in vitro* génmegőrzési technika fejlesztésére.

Köszönetnyilvánítás

A szerzők köszönetet mondanak Dr. Posta Katalin Rektorhelyettes és Intézetigazgató Asszonynak, hogy intézetében lehetővé tette a kutatási környezet kialakítását és Dr. Áprily Szilvia Intézetigazgató Asszonynak, hogy támogatja az intézetek együttműködésével megvalósuló közös kutatási munkákat, valamint Dr. Gyulay Gyula állatorvos kollégánknak (Embriobos Kft) az OPU IVEP kísérletekben nyújtott szakmai segítségéért. Továbbá köszönettel tartoznak a gyöngyösi Tendon Kft. szarvasmarha vágóhíd dolgozóinak, akik a petefészkek gyűjtése által hozzájárulnak a kísérletek megvalósulásához, és hallgatóinknak, Hussamaldin Mohamed Ahmed Adamnak és Delgado Quinonez Gustavo Harrisonnak, akik aktívan részt vesznek a kísérleti munkában.

Az IVEP rendszer kidolgozásához a NKHFH 2020-1.1.2-PIACI-KFI-2021-00305, Táplálkozásfiziológia szempontból széleskörűen akceptált ipari tej előállítását támogató technológiák fejlesztése molekuláris biológiai eszközökkel, valamint a 2020-1.1.2-PIACI-KFI-2021-0033, „Állatjóléti szempontból optimalizált petesejt kinyerési technikák és embrió előállítás fejlesztése kereskedelmi célú gaméta és embrióbank kialakításához” konzorciális pályázatok nyújtottak támogatást.

Irodalomjegyzék

- Bittner, L., Wyck, S., Herrera, C., Siuda, M., Wrenzycki, C., van Loon, B., Bollwein, H. (2018): Negative effects of oxidative stress in bovine spermatozoa on in vitro development and DNA integrity of embryos. *Reproduction, Fertility and Development*, 30, 1359–1368. <https://doi.org/10.1071/RD17533>
- Bousquet, D., Twagiramungu, H., Morin, N., Brisson, C., Carboneau, G., Durocher, J. (1999): In vitro embryo production in the cow: an effective alternative to the conventional embryo production approach. *Theriogenology*, 51, 59–70. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(98\)00231-3](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(98)00231-3)
- Brackett, B. G., Bousquet, D., Boice, M. L., Donawick, W. J., Evans, J. F., Dressel, M. A. (1982): Normal development following in vitro fertilization in the cow. *Biology of Reproduction*, 27, 147–158. <https://doi.org/10.1095/biolreprod27.1.147>
- Cairo Consensus Group (2018): 'There is only one thing that is truly important in an IVF laboratory: everything' Cairo Consensus Guidelines on IVF Culture Conditions. *Reproductive BioMedicine Online*, 40, 33–60. <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2019.10.003>
- Ferré, L. B., Kjelland, M. E., Strøbech, L. B., Hyttel, P., Mermillod, P., Ross, P. J. (2020): Review: Recent advances in bovine in vitro embryo production: reproductive biotechnology history and methods. *Animal*, 14, 991–1004. <https://doi.org/10.1017/S1751731119002775>
- Greve, T., Madison, V. (1991): In vitro fertilization in cattle: a review. *Reproduction, Nutrition and Development*, 31, 147–157. <https://doi.org/10.1051/rnd:19910205>
- Hallberg, I., Kjellgren, J., Persson, S., Örn, S., Sjunnesson, Y. (2019): Perfluorononanoic acid (PFNA) alters lipid accumulation in bovine blastocysts after oocyte exposure during in vitro maturation. *Reproductive Toxicology*, 84, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2018.11.005>
- Halstead, M. M., Ma, X., Zhou, C., Schultz, R. M., Ross, P. J. (2020): Chromatin remodeling in bovine embryos indicates species-specific regulation of genome activation. *Nature Communications*, 11, 4654. <https://www.nature.com/articles/s41467-020-18508-3>
- Hansen, P. J. (2006): Realizing the promise of IVF in cattle - an overview. *Theriogenology*, 65, 119–125. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2005.09.019>

- Hawke, D. C., Watson, A. J., Betts, D. H. (2021): Extracellular vesicles, microRNA and the preimplantation embryo: non-invasive clues of embryo well-being. *Reproductive Biomedicine Online*, 42, 39–54. <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2020.11.011>
- Isaac, E., Berg, D. K., Pfeffer, P. L. (2024): Using extended growth of cattle embryos in culture to gain insights into bovine developmental events on embryonic days 8 to 10. *Theriogenology*, 214, 10–20. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2023.10.004>
- Jiang, Z. (2024): Molecular and cellular programs underlying the development of bovine preimplantation embryos. *Reproduction, Fertility and Development*, 36, 34–42. <https://doi.org/10.1071/RD23146>
- Langbein, A. N., Hannelore, F. M. D., Bartholomeus, E., Jo, L. M. R. L., Peter, E. J. B. (2015): Bovine in vitro reproduction models can contribute to the development of (female) fertility preservation strategies. *Theriogenology*, 84, 477–489. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2015.04.009>
- Lange-Consiglio, A., Lazzari, B., Pizzi, F., Idda, A., Cremonesi, F., Capra, E. (2020): Amniotic microvesicles impact hatching and pregnancy percentages of in vitro bovine embryos and blastocyst microRNA expression versus in vivo controls. *Scientific Reports*, 10, 501. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-57060-z>
- Lopera-Vasquez, R., Hamdi, M., Maillou, V., Gutierrez-Adan, A., Bermejo-Alvarez, P., Ramírez, M. Á., Yáñez-Mó, M., Rizo, D. (2017): Effect of bovine oviductal extracellular vesicles on embryo development and quality in vitro. *Reproduction*, 153, 461–470. <https://doi.org/10.1530/REP-16-0384>
- Menezo, Y. J., Herubel, F. (2002): Mouse and bovine models for human IVF. *Reproductive Biomedicine Online*, 4, 170–175. [https://doi.org/10.1016/s1472-6483\(10\)61936-0](https://doi.org/10.1016/s1472-6483(10)61936-0)
- Menjivar, N. G., Gad, A., Gebremedhn, S., Ghosh, S., Tesfaye, D. (2023): Granulosa cell-derived extracellular vesicles mitigate the detrimental impact of thermal stress on bovine oocytes and embryos. *Frontiers in Cell Developmental Biology*, 11, 1142629. <https://doi.org/10.3389/fcell.2023.1142629>
- Pinzón-Arteaga, C. A., Wang, Y., Wei, Y., Ribeiro Orsi, A. E., Li, L., Scatolin, G., Liu, L., Sakurai, M., Ye, J., Ming, H., Yu, L., Li, B., Jiang, Z., Wu, J. (2023): Bovine blastocyst-like structures derived from stem cell cultures. *Cell Stem Cell*, 30, 611–616, e7 <https://doi.org/10.1016/j.stem.2023.04.003>
- Sirard, M. A. (2018a): The influence of in vitro fertilization and embryo culture on the embryo epigenetic constituents and the possible consequences in the bovine model. *Journal of Developmental Origins of Health and Disease*, 8, 411–417. <https://doi.org/10.1017/s2040174417000125>
- Sirard, M. A. (2018b): 40 years of bovine IVF in the new genomic selection context. *Reproduction and Fertility*, 156, R1–R7. <https://doi.org/10.1530/rep-18-0008>
- Sirard, M. A., Lambert, R. D. (1986): Birth of calves after in vitro fertilisation using laparoscopy and rabbit oviduct incubation of zygotes. *Veterinary Record*, 119, 167–169. <https://doi.org/10.1136/vr.119.8.167>
- Sirard, M. A., Parrish, J. J., Ware, C. B., Leibfried-Rutledge, M. L., First, N. L. (1988): The culture of bovine oocytes to obtain developmentally competent embryos. *Biology of Reproduction*, 39, 546–552. <https://doi.org/10.1095/biolreprod39.3.546>
- Speckhart, S. L., Wooldridge, L. K., Ealy, A. D. (2023): An updated protocol for in vitro bovine embryo production. *Cell Press STAR Protocols* 4, 101924. <https://doi.org/10.1016/j.xpro.2022.101924>

A műre a Creative Commons 4.0 standard licenc alábbi típusa vonatkozik: CC-BY-NC-ND-4.0.

This work is licensed under a [Creative Commons Attribution-Non Commercial-No Derivatives 4.0 International License](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).

