



A zona pellucidában vitrifikáció után bekövetkezett változások összehasonlítása *in vitro* és *in vivo* érlelt csupasz és kumuluszsejttel körülvevett sertés petesejtekénél

VARGA ERIKA¹ – EGRSZEGI ISTVÁN² – RÁTKY JÓZSEF² – KISS RÉKA¹ –
TEMPFLI KÁROLY¹ – BALI PAPP ÁGNES¹

¹ Nyugat-magyarországi Egyetem
Mezőgazdaság- és Élelmiszertudományi Kar
Állattudományi Intézet
Mosonmagyaróvár

² Állattenyésztési és Takarmányozási Kutatóintézet
Herceghalom

ÖSSZEFOGLALÁS

Az intakt zona pellucida (ZP) átlagos vastagsága, valamint az ovulált oociták átlagos átmérője nagyobb, mint az *in vitro* maturáltaknak. A ZP morfológia alapján a sperma penetrációt követő ZP reakció sokban különbözhet az IVM és ovulált oociták között. A petesejtek krioprezervációját követő embrió beültetéseket követően alacsony a vemhesülési arány, amely az embriók limitált fejlődési, illetve implantációs képességével magyarázható. Nagy valószínűséggel ebben közrejátsszik, hogy a vitrifikáció során a ZP sérül. A sérülés mértéke függhet attól, hogy a ZP csupasz vagy kumuluszsejtekkel körülvevő-e a hűtési folyamat kezdetén. Ezen folyamatok jobb megértéséhez a jelen kísérletsorozatban a ZP-ban vitrifikáció után bekövetkezett változásokat hasonlítottuk össze *in vitro* és *in vivo* érlelt csupasz, illetve kumuluszsejtekkel borított sertés petesejtekénél.

A vitrifikált/visszamelegített IVM petesejtek degenerálódási aránya a csupasz petesejtek esetében szignifikánsan ($P < 0,05$) nagyobb volt ($78,08 \pm 1,88\%$), mint a kumuluszsejtekkel borított oociták csoportjában ($57,04 \pm 1,55\%$).

Az *in vitro* maturált és a preovulációs petesejtek zónájának pronáz hatására bekövetkező oldódását vizsgálva a vitrifikációt követően megállapítottuk, hogy a kontroll preovulációs petesejtek ZP-jának pronázos emésztési ideje szignifikánsan hosszabb ideig tartott, mint a vitrifikált petesejteké. Az *in vitro* maturáltatott petesejtek esetében hasonló eltérést tapasztaltunk, ugyanakkor szignifikánsan hosszabb idő kellett a kumuluszsejtekkel körülvevő petesejtek zónájának emésztéséhez, mint a lecsupaszított petesejtekéhez. A pronázos emésztés eredménye alapján megállapítható, hogy a kumuluszsejtekkel körülvevő *in vivo* és *in vitro* érlelt oociták ZP-ja egyaránt kevesebb károsodást szenvedett a vitrifikáció során. Az *in*

vitro érlelt és vitrifikált csupasz petesejtek emésztési ideje lényegesen kevesebb, mint a többi vizsgált csoporté, ami jelzi a ZP hűtés során bekövetkező károsodásának a mértéket.

Kulcsszavak: vitrifikáció, sertés, petesejt, ZP.

BEVEZETÉS

Ebben az évezredben a sertést általánosan használják a klónozási kutatásokban, különösen a szervtranszplantációs hasznosítás érdekében. Az *in vitro* érlelt sertés petesejt krioprezervációs kutatások fejlesztése a klónozási kutatások mellett, a transzgenetikus állat előállítás és a génmegőrzés – mélyhűtött ivarsejt-bankok létrehozása – a veszélyeztetett állatok megőrzése szempontjából is fontos.

A petesejtek krioprezervációját követő embrió beültetések során napjainkig igen alacsony a vemhesülési arány, amely az embriók limitált fejlődési, illetve implantációs képességével magyarázható egégnél (Carroll *et al.* 1990), sertésnél (Isachenko *et al.* 1998, Berthelot *et al.* 2000, Rojas *et al.* 2004) valamint humán vonatkozásban is (Ghetler *et al.* 2006). Magyarországon a humán petesejtfagyasztás, -visszaolvasztás, termékenyítés módszerének eredményességét az első magyar kisbaba megszületése bizonyítja (Konc *et al.* 2008). A megfelelő petesejtek kiválasztásában nagyon hasznos az osztódási orsó állapotának vizsgálata (Kanyó *et al.* 2004)

Wu *et al.* (2006) kísérleteikben 58 kontroll petesejtet vizsgálva megállapították, hogy 79,5% normál morfológiát mutatott, és a kromoszómák az equatoriális síkba rendeződtek. A vitrifikált éretlen (germinális vezikulum állapotú; GV) és az érett, metafázis II (MII) petesejteknel egyaránt szignifikánsan ($P < 0,05$) csökkent (10,1 és 12,9%) a normális magorsó szerveződés. A normál F-aktin megoszlású vitrifikált GV és MII petesejtek aránya jóval alacsonyabb volt, mint a kontrollé (16,9; 37,2 és 72,3%)

Egy évvel később Shi *et al.* (2007) a vitrifikáció után előforduló normál osztódási konfiguráció tekintetében lényegesen jobb eredményeket kaptak (43,5%) de még így is szignifikánsan ($P < 0,05$) alacsonyabb volt ez az arány a kontrollénál (81,0%).

Juh petesejtek „hűtőkacs” technikával végzett vitrifikációja során a petesejtek közvetlenül a visszamelegítés után szintén alacsonyabb normál magorsó és kromoszóma konfigurációt mutattak a kontrollal összehasonlítva (59,1 és 83,3%; $P < 0,01$) majd két óra kultiválás után vizsgálva a vitrifikált petesejteknel ez a paraméter tovább csökkent (Succu *et al.* 2007a). Néhány kutató úgy találta, hogy az emlős petesejtek mélyhűtésének hatására a kortikális granulomok exocitózisa a petesejt érése előtt megtörténik (Vincent *et al.* 1990). A bekövetkező zóna keményedés megakadályozhatja a spermiumbehatolást és a fertilizációt. Azonban más kutatók vizsgálatai nem igazolták, hogy ilyen változás lenne a kortikális granulomok viselkedésében (Van Blerkom és Davis 1994). A kumuluszsejteket tartalmazó vagy csupasz *in vitro* maturált petesejteket elemezve azt tapasztalták, hogy a kortikális granulomok (CG) megoszlásában és denzitásában nem volt szignifikáns különbség. Azonban szignifikáns denzitáscsökkenést figyeltek meg ($P < 0,01$) a fertilizált és az *in vitro* maturált petesejteket összehasonlítva (Romar *et al.* 2005).

A különböző fejlettségi stádiumú sertés petesejtek másképpen reagálnak a krioprezervációra: az MII stádiumú oociták ellenállóbbak a mélyhűtéssel szemben, mint a GV stádiumúak. A GV oocitákat etilén-glikol (EG) vagy vitrifikáció hatásának kitéve a kromoszóma konfigurációban és a magorsófonalak állapotában drámai változásokat tapasztaltak és az *in vitro* fertilizáció sikertelen volt. Amikor az MII oociták voltak EG hatásának vagy vitrifikációnak kitéve 18%, illetve 11%-ban maradt fenn a megfelelő magorsó szerkezet. Az EG önmagában vagy a vitrifikációs eljárás során a legtöbbször maradandó változásokat idézett elő a mikrofilamentumok szerkezetében. Az EG kezelésen átesett vagy vitrifikált érett petesejtek osztódóképessége 14%, illetve 13% volt, ami szignifikánsan kevesebb volt, mint a kontroll (69%) (Rojas *et al.* 2004).

Transzmissziós elektronmikroszkópos vizsgálatok eredményei azt mutatták, hogy a vitrifikáció különböző fokú károsodásokat okozhat a GV petesejtekben. Néhány petesejtnél a kumuluszsejtek különváltak a kumulusz-oocita komplextől (COC), és a ZP sérült volt a kumuluszsejtekkel határos részeken. A kumuluszsejtek közötti szoros kapcsolódás (gap junction) is roncsolódott, és sok mikrovillus sérült volt vagy hiányzott, és csak homogén lipidcseppek voltak megfigyelhetők. Az MII petesejteknél a kortikális granulomok az oolemma alatt sorakoztak. Csak morfológiailag rendezetlen heterogén lipidcseppek és körülöttük nagy vakuólumok voltak jellemzők (Wu *et al.* 2006).

Mindezek a kísérleti eredmények igazolják, hogy a hűtési módszer fejlesztése szükséges, melyre újabban, többek között a következő próbálkozások történtek:

Du *et al.* (2008) a kriotolerancia növeléséhez magas hidrosztatikus nyomásos előkezelést alkalmaztak IVM oocitáknál. Fejlődőképességük elősegítésére a partenogenetikus aktiválás után 20 MP nyomáskezelést alkalmaztak 70 percig 25, illetve 37 °C-on, az utóbbi hőmérsékleten előkezelt petesejtek esetében szignifikánsan magasabb blasztociszta ($14,1 \pm 1,4\%$) arány alakult ki, mint 25 °C-on előkezeltéknél ($5,3 \pm 1,1\%$; $P < 0,01$).

Más kutatók egyéb új utakat keresnek. Először nyert igazolást Wu *et al.* 2004-ben végzett kísérletei alapján, hogy normál embriók állíthatók elő ZP-mentes petesejtek *in vitro* fertilizációja során a kultiválási feltételek optimalizálásával. Az akroszóma státusz specifikus fluoreszcens jelölésével (FITC-PNA) igazolódott, hogy a fagyasztott/visszaolvasztott sertés spermiumban lejátszódhat az akroszóma reakció és penetrálódhat a petesejtbe zóna reakció nélkül is. Ezek az eredmények azt sugallják, hogy az akroszóma reakció indukálására más anyagcsereutak is létezhetnek a fertilizáció folyamatában, a széles körben elfogadott spermium-zóna receptor modellen kívül, bár ezen eredmények további igazolása szükséges.

Bizonyos hűtési és visszamelegítési körülmények között az emlős petesejtek ZP-jának több, mint 50%-a károsodást szenvedhet (Schiewe *et al.* 1991). A ZP károsodást különböző emlőállatoknál megfigyelték (Dumoulin *et al.* 1994, Van den Abbeel és Van Steirteghem 2000, Silva *et al.* 2005, Ko *et al.* 2008) és számos tanulmányban beszámoltak arról, hogy az ilyen károsodások befolyásolják a későbbi *in vitro* és *in vivo* fejlődést (Kasai *et al.* 1996, Mavrides és Morrol 2005).

A jelen kísérletsorozatban a ZP-ban vitrifikáció után bekövetkezett változásokat hasonlítottuk össze *in vitro* és *in vivo* érlelt csupasz és kumuluszsejttel körülvevett sertés petesejteknél.

ANYAG ÉS MÓDSZER

Vegyszerek

A felhasznált vegyszereket a Sigma-Aldrich Kft-től (Budapest) és a Werft-Chemie GmbH-től (Bécs) vásároltuk. A szervek laboratóriumba szállítása 38 °C-os fiziológiás sóoldatot (0,9% [w/v] NaCl) tartalmazó termoszban történt. A petefészkeket CETAB-, majd fiziológiás sóoldatban háromszor átmosva fertőtlenítettük.

A kumulusz-petesejt komplexek (COC) kinyeréséhez TL-Hepes oldatot (*Hagen et al.* 1991) használtunk, melyet 0,1% polivinil-alkohollal egészítettünk ki (TL-Hepes-PVA).

A petesejteket NCSU-37 oldatban (*Petters és Wells* 1993) maturáltattuk, melyet 0,57 mM ciszteaminnal, 1mM dibutilil ciklikus adenzin monofoszfáttal (cAMP), 5 g/mg inzulinnal, 50 mM merkaptotetanollal, 1 mM glutaminnal, 10 NE/ ml eCG-vel, 10 ng/ml EGF-el, és 10% sertés follikulusz-folyadékkal egészítettünk ki.

A vitrifikációs eljárás során használt alapoldat Hepes/TCM-199 volt, melyet 5 mg/ml szarvasmarha-szérumalbuminnal (BSA) egészítettünk ki.

A fagyasztáskor az alapoldathoz krioprotektív anyagokat (CPA) adtunk [etilén-glikol (EG), dimetil-szulfoxid (DMSO)], melyek végső koncentrációja 6,5–6,5 M volt.

A visszamelegítés során a CPA-k kivonásához és a rehidráláshoz az oldatokhoz csökkenő koncentrációban (0,75, illetve 0,5 M) szaharózt adtunk.

Kísérleti elrendezés

A tanulmány két kísérletsorozatot mutat be.

Az első kísérletben a kumuluszsejtek *in vitro* maturált (MCOC-csoport = kumuluszsejtekkel körülvett IVM petesejtek; MD-csoport = lecsupaszított IVM petesejtek) és preovulációs (POCOC-csoport = preovulációs, kumuluszsejtekkel rendelkező petesejtek; POD-csoport = preovulációs, lecsupaszított oociták) petesejtek életképességére gyakorolt hatását vizsgáltuk a vitrifikáció során.

A második kísérletsorozatban az *in vitro* maturált (MCOC-, MD-csoport) és a preovulációs (POCOC-, POD-csoport) petesejtek zónájának pronáz hatására bekövetkező oldódását hasonlítottuk össze.

Petesejtek kinyerése és *in vitro* érlelése (IVM)

A vizsgálatokhoz sárgatest és ciszta nélküli petefészkeket használtunk. A 3–6 mm átmérőjű tüszőkből a tüszőfolyadékot és a benne lévő kumulusz-petesejt komplexeket (COC) 10 ml-es kézifecskendő és a hozzá csatlakoztatott 18 G-jelű tű segítségével szívtuk le, majd a follikulusz folyadékot (benne az oocitákkal) centrifugacsövekbe gyűjtöttük. A sejtek leülepedése és a felülúszó eltávolítása után a visszamaradt sejteket Tl-Hepes-PVA oldattal reszuszpendáltuk, majd mikroszkóp (Nikon) segítségével (40x nagyítás) megkezdjük a COC-k kiválogatását.

Az IVM-hoz csak jó minőségű, többretegű, kompakt kumuluszállománnyal rendelkező petesejteket használtunk fel. A COC-ket háromszor átmostuk NCSU-37 oldatban, majd „négylyukú” tenyésztőedényben (NUNC), 50 COC/500 µl NCSU-37 oldatban, 42 órán keresztül, 5% CO₂-tartalmú gázkeverékben, 38,5 °C-on érleltük. A maturáció első felében (0–20 óra) az oldatot hormonnal egészítettük ki (10 NE/ml eCG); az IVM második részében (20–42 óra) a petesejtek tenyésztése hormonmentes oldatban történt.

A maturáció eredményességének elbírálása az expandálódási arány és a maturációs ráta, kifejezésével történt. Ennek meghatározásához az IVM után, 30–30 COC-t, véletlenszerűen kiválogattunk, majd feljegyeztük, hogy a sejtek mekkora része rendelkezett expandálódott kumuluszállománnyal. Ezt követően pipettázással eltávolítottuk a kumuluszsejteket a petesejtek felszínéről, majd az oocitákat ecetsav és etanol 1:3 arányú keverékében 3 napig fixáltuk, majd a sejteket 0,1%-os ecetsavas-orcinnel festettük, és mikroszkóp segítségével (400x nagyítás) megvizsgáltuk a sejtmagot. Érettnek tekintettük azokat a petesejteket, melyek metafázis II osztódási stádiumban voltak.

Preovulációs (in vivo maturálódott) petesejtek kinyerése

Négy magyar nagy fehér x lapály kocasüldő (8–9 hónapos, 110–120 kg-os) ciklusát szinkronizáltuk progesztagén hatású Regumate® etetésével. Az állatok naponta 16 mg Regumate®-t kaptak 15 napon keresztül. Huszonnégy órával az utolsó Regumate® etetést követően az állatoknak 1000 NE eCG-t (tüszőnövekedés stimulálása), majd 72 órával később 50 µg GnRH-t applikáltunk (ovuláció indukció). A GnRH kezelés után 34 órával kezdtük meg a COC-k gyűjtését, laparotómias eljárással. Az invazív állatkísérletek végzése a Pest Megyei Állategészségügyi és Élelmiszerellenőrző Állomás 205/024/Pest/2006 etikai bizottsági engedélye alapján történt. A műtéti narkózist 100 testsúly kg-onként 10 ml ketaminnal (SBH-Ketamin, SelBrutta) és 4 ml xylazinnal (Xylavet, Lavet) intravénásan biztosítottuk. Az 5 mm-nél nagyobb follikulusokból kézfecskendő és a hozzá kapcsolt tű segítségével nyertük ki a petesejteket.

Petesejtek vitrifikációja

A petesejteket a *Vajta et al.* (1997) által bemutatott „nyitott végű műszalma” (OPS) eljárással vitrifikáltuk. A fagyasztást megelőzően a petesejteket krioprotektív anyagokat (CPA) tartalmazó oldatokban, 2 lépcsőben ekvilibráltattuk. Az első ekvilibráció (3 perc) során alkalmazott oldatban a CPA-k (EG és DMSO) koncentrációja 2–2 M volt, míg a második ekvilibráció (1 perc) 6,5–6,5 M EG-t és DMSO-t tartalmazó oldatban történt. Ezt követően a petesejteket tartalmazó, körülbelül 10 µl nagyságú médiumcseppeket nyitott végű, leszűkített keresztmetszetű műszalmákba szívtuk fel kapilláris elven, majd azonnal folyékony nitrogénbe mártottuk azokat.

Visszamelegítés

A petesejtek visszamelegítése három lépcsőben történt. A műszalmákat ujjaink közé fogva (~36 °C) felmelegítettük 0,5–1 perc alatt. A melegítés során a petesejteket 5–5 percig, csökkenő szaharóz-koncentrációjú (0,75 M, majd 0,5 M) oldatokban ekvilibráltattuk, végül az oocitákat szaharózmentes alapoldatba helyeztük.

A petesejtek vizsgálata a visszamelegítést követően

A visszamelegítés után mikroszkóp segítségével (40x nagyítás) megvizsgáltuk a petesejtek morfológiáját. Azokat a petesejteket, melyek ooplazmája sötét és homogén volt, a ZP-juk nem sérült, illetve a petesejtek alakja nem változott meg, normálisnak tekintettük. Abnormálisnak tekintettük azokat az oocitákat, melyekben strukturális változásokat figyeltünk meg, sérült a ZP-juk, citoplazmájuk világos, töredezett volt.

A zona pellucida szerkezetének vizsgálata

A visszamelegítést követően csoportonként 30–40 petesejtet PBS oldatba (Kim et al. 1997) helyeztük, majd pipettázással eltávolítottuk felszínükről a kumuluszsejteket (MCOC, POCC), végül 100 µl 0,1% (w/v) pronáz oldatot adtunk az alap PBS oldathoz. Mikroszkóp segítségével (400x nagyítás) folyamatosan figyeltük a petesejteket és feljegyeztük, hogy mennyi idő alatt emésztődött meg a ZP.

Statisztikai vizsgálatok

Minden vizsgálatot háromszor megismételtünk. Az eredmények értékelése a STATISTICA programmal (ANOVA) történt. A csoportok közötti különbségeket Duncan's teszttel vizsgáltuk. Szignifikáns különbségnek azt tekintettük, ahol a valószínűség $P < 0,05$ volt.

EREDMÉNYEK

A petesejtek életképessége a vitrifikációt követően

In vitro érlelt, kumuluszsejtekkel körülvett [MCOC csoport (n = 255)] és szintén *in vitro* maturált, de a kumuluszsejtektől a maturációt követően teljesen lecsupaszított petesejteket [MD csoport (n = 215)] vitrifikáltunk a nyitott, kihúzott végű műszalma (OPS) módszerrel. Kontrollcsoportként (n = 217) sertés petesejteket maturáltattunk *in vitro*, 42 órán keresztül. Megvizsgáltuk a petesejtek szerkezetében bekövetkező és a sejtmag érését jelző morfológiai változásokat a visszamelegítés után (1. kép).

42 óra *in vitro* maturációt követően megállapítottuk, hogy a vizsgált kontroll petesejtek esetében a kumuluszsejtek expandálódási rátája $89,33 \pm 6,11\%$ volt, míg a sejtek $82,67 \pm 6,11\%$ -a elérte a metafázis II állapotot. Ez alapján a maturációs rendszer megfelelőnek bizonyult a petesejtek mesterséges érleléséhez.

A vitrifikált/visszamelegített petesejtek degenerálódási aránya az MD-csoportban szignifikánsan ($P < 0,05$) nagyobb volt ($78,08 \pm 1,88\%$), mint az MCOC csoportban ($57,04 \pm 1,55\%$).

1. kép (A) Kumulusz-petesejt komplex expandálódott kumuluszállománnyal az IVM 42. órájában

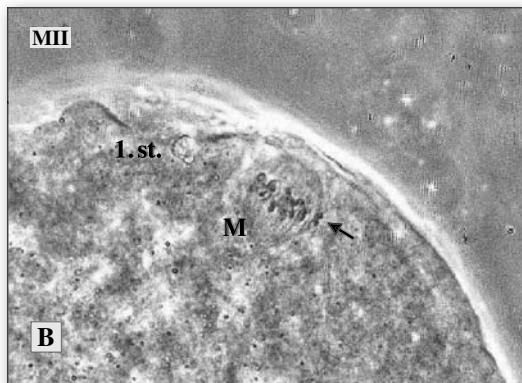
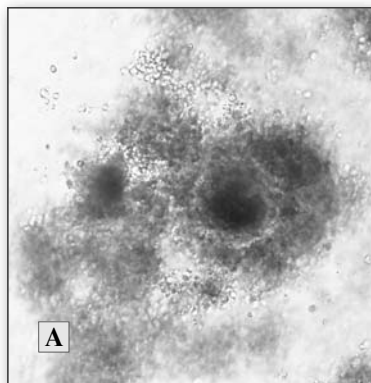
(B) érett, MII petesejt az IVM 42. órájában

M = kromoszómák metafázisban, 1. st. = első sarkitest

Picture 1. (A) Cumulus-oocyte complex with expanded cumulus cells at 42 h of IVM

(B) matured, metaphase II stage oocyte at 42 h of IVM

M = chromosomes at metaphase, 1 st.= first polar body



A ZP oldódásának vizsgálata (2. kép)

2. kép Sertés fagyasztott/visszamelegített petesejtek a ZP eltávolítása után

(A) petesejt intakt plazmamembránnal, látható sarkitesttel,

(B) petesejt ép plazmamembránnal,

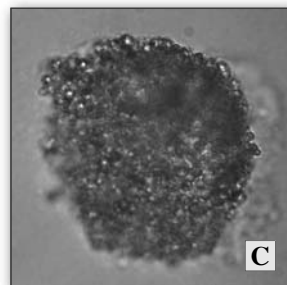
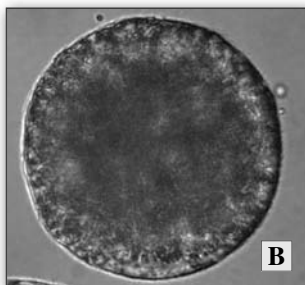
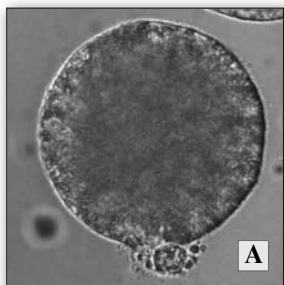
(C) feloldódott plazmamembrán, degenerálódott petesejt

Picture 2. Porcine vitrified/warmed oocytes after ZP digestion

(A) oocyte with intact plasma membrane, with visible polar body,

(B) oocyte with intact plasma membrane,

(C) degenerated oocyte with dissolved plasmamembrane



1. Preovulációs (*in vivo* maturált) petesejtek

A preovulációs petesejtek esetében a pronázos emésztési idő $295,60 \pm 46,11$ másodperc volt, ami szignifikánsan több, mint az POCOC- ($225,25 \pm 32,69$ másodperc) és az POD-csoportban ($217,5 \pm 29,06$ másodperc).

2. *In vitro* maturált petesejtek

Az *in vitro* maturált kontroll csoportban a ZP emésztési ideje szignifikánsan hosszabb ideig tartott ($252,52 \pm 37,4$ másodperc), mint az MCOC- ($213,34 \pm 98,42$ másodperc) és az MD-csoportokban ($118,54 \pm 73,98$ másodperc). Ugyanakkor megállapítható az is, hogy az MD-csoportban a ZP szignifikánsan gyorsabban bomlott le, mint az MCOC-csoportban.

3. A preovulációs és az IVM petesejtek ZP-változásainak összehasonlítása

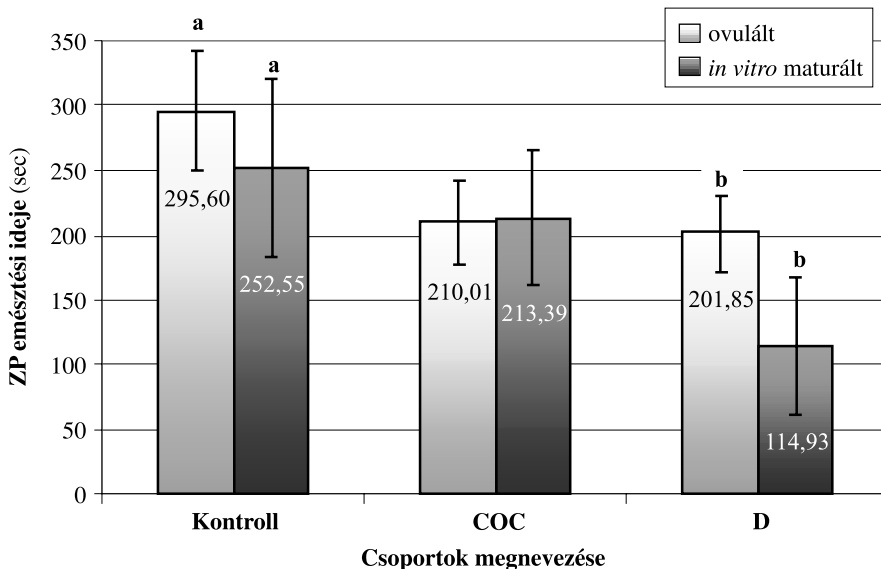
A kontroll preovulációs petesejtek pronázos emésztési ideje $295,6 \pm 46,11$ másodperc volt, ami szignifikánsan több, mint a kontroll *in vitro* maturált oociták esetében ($252,52 \pm 37,4$ másodperc). A pronázos emésztési kísérletek alapján megállapíthatjuk, hogy a kumuluszsejtekkel körülvett *in vivo* és *in vitro* érlelt oociták ZP-ja egyaránt kisebb károsodást szenvedett a vitrifikáció során. A csupasz petesejtek esetében látszik, hogy az *in vitro* érlelt és vitrifikált petesejtek emésztési ideje lényegesen rövidebb, mint a többi vizsgált csoporté, tehát ebben az esetben sérült legjobban a ZP (1. ábra).

1. ábra *In vitro* maturálódott és az ovulált oociták zónájának emésztése pronázzal

* Az azonos betűk jelölik a szignifikáns különbségeket ($P < 0,05$)

Figure 1. ZP digestion of *in vitro* matured and ovulated oocytes

* The same letters indicate significant differences ($P < 0.05$)



KÖVETKEZTETÉSEK

Funahashi et al. (2000) szkennung elektron mikroszkópos (SEM) vizsgálatokkal megállapította, hogy az intakt ZP átlagos átmérője és annak átlagos vastagsága nagyobb volt az ovulált oocitáknak, mint az *in vitro* maturáltaknak. A ZP vastagsága nagyobb volt az *in vivo* zigótáknak, mint a petesejteknek, míg az IVM–IVF zigóták nem különböztek az IVM petesejtektől. Ez az eredmény azt jelzi, hogy a ZP morfológia és a sperma penetrációt követő ZP reakció jelentősen különbözik az IVM és ovulált oociták között.

Michelmann et al. (2007) vizsgálták a zónamorfológiát és a spermakötő mintázatot sertésnél. A petesejtek négy csoportját különböztették meg: éretlen, *in vivo* érlelt, *in vitro* maturáltatott 24, vagy 48 h-ig. Ezen kívül *in vivo* vagy *in vitro* fejlődött korai embriók zónamorfológiáját is elemezte. Azt tapasztalta, hogy négy különböző zónamorfológia határozható meg. A kategóriák a porózus hálószerű struktúrától a megközelítőleg sima és kompakt felszínig terjedtek. Az előző szerzőkkel nem egyező eredményeket kapott, ugyanis nem talált különbséget az *in vitro* és *in vivo* érlelt petesejtek és a zóna szerkezete között. Vizsgálatai szerint az összes petesejtcsoport nagyon heterogén zónamorfológiát mutatott, és nem volt tisztán értékelhető összefüggés a kategóriákon belül. Az embriófejlődést vizsgálva azt tapasztalta, hogy *in vivo* embriófejlődés során a zónafelszín a porózus struktúrától a kompakt felszín felé változott, addig az *in vitro* embriók kompaktak maradtak a fejlődés összes stádiumában.

Succu et al. (2007b) kettős fluoreszcens festést alkalmazva vizsgálták a vitrifikáció hatását juh petesejtek ZP integritására, és az eredményeik azt mutatták, hogy visszamelegítés után alacsonyabb membránintegritás volt megfigyelhető a vitrifikált csoportnál ($P < 0,01$), mint a kontrollnál.

Az *in vivo* és *in vitro* érlelés közötti különbséget igazolja, hogy megállapították, a petevezető specifikus glikoprotein (OGP) az ivari ciklus során helyileg és időben különbözőképpen expresszálódik és lokalizálódik az érett petesejtek és az embriók ZP-ján, a perivitellinális terében és plazmamembránján. *McCauley et al.* (2003) kísérleteikben az *in vitro* maturáltatott sertés petesejtekhez, vagy a kapacitáción átesett spermiumokhoz OGP-t adva azt tapasztalták, hogy csökkent a polispermia, valamint a spermiumok kötődő képessége a zónához, de magas penetrációs arányt sikerült elérniük.

Szükség van az *in vitro* és *in vivo* érési folyamatok, valamint a vitrifikáció során létrejött változások pontosabb feltárására. Megállapítottuk, hogy a vitrifikált/visszamelegített IVM petesejtek degenerálódási aránya a csupasz petesejtek esetében szignifikánsan ($P < 0,05$) nagyobb volt ($78,08 \pm 1,88\%$), mint a kumuluszsejtekkel borított oociták csoportjában ($57,04 \pm 1,55\%$).

A vitrifikáció során a ZP sérül és a sérülés mértéke függ attól, hogy a ZP csupasz vagy kumuluszsejtekkel körülvett-e a hűtési folyamat kezdetén. Az *in vitro* maturált és a preovulációs petesejtek zonájának pronáz hatására bekövetkező oldódását vizsgálva a vitrifikációt követően megállapítottuk, hogy a kumuluszsejtekkel körülvett *in vivo* és *in vitro* érlelt oociták ZP-ja egyaránt kisebb mértékben károsodott a vitrifikáció során, mint a lecsupaszított petesejteké.

Az *in vivo* és *in vitro* maturált petesejtek zona pellucidájának szerkezete eltérő, szignifikáns különbséget találtunk a pronázos emésztési idő tekintetében, mind a kontroll, mind a vitrifikált/visszamelegített csupasz petesejteknél. Laboratóriumi vagy természetes úton éretté vált kumuluszsejtes vitrifikált/visszamelegített petesejtek zonájának pronázos emésztési idejében azonban nem volt szignifikáns különbség, ez jelzi, hogy a kumuluszsejtek ZP-t védő szerepe jelentős a hűtés/visszamelegítés folyamatában.

Az *in vitro* érlelt és vitrifikált csupasz petesejtek emésztési ideje lényegesen kevesebb, mint a többi vizsgált csoporté, ami jelzi a ZP hűtés során bekövetkező károsodásának mértéke ebben az esetben a legjelentősebb.

Study of zona pellucida modifications in *in vitro* and *in vivo* matured porcine oocytes after vitrification with or without cumulus cells

ERIKA VARGA¹ – ISTVÁN EGRSZEGI² – JÓZSEF RÁTKY² –

RÉKA KISS¹ – KÁROLY TEMPFLI¹ – ÁGNES BALI PAPP¹

¹ University of West Hungary
Faculty of Agricultural and Food Sciences
Institute of Animal Breeding
Mosonmagyaróvár

² Research Institute for Animal Breeding and Nutrition
Herceghalom

SUMMARY

The morphology of zona pellucida (ZP) and the ZP reaction at sperm penetration appears to be quite different between IVM oocytes and preovulatory ones. Unfortunately, the cryopreservation of oocytes has been associated with low pregnancy rate after embryo transfer, which could be originated from limited developmental and implantation competence of these embryos. ZP damage has been determined in different mammalian species and several studies have reported a detrimental effect of these injuries on further *in vitro* and *in vivo* development of the embryos. The degree of cryoinjuries could be depend on the presence or absence of cumulus cells around the ZP during vitrification.

The objective of the present study was to assess the zona pellucida modifications in *in vitro* and *in vivo* matured porcine oocytes after vitrification with or without cumulus cells.

The degeneration rate of denuded vitrified/warmed oocytes (78.08±1.88%) was significantly ($P < 0.05$) higher than in oocytes with cumulus cells (57.04±1.55%).

Our results suggest that the digestion time of the control preovulatory oocytes' ZP was significantly longer than vitrified ones'. It was found the same result in the *in vitro* matured groups too, furthermore an effect of cumulus cells was observed on the digestion results.

Oocytes surrounded with cumulus cells needed significantly more time to dissolve the ZP than for denuded oocytes.

The results demonstrated that the *in vitro* matured and denuded vitrified/warmed oocytes need the least time to dissolve the ZP, consequently in this group were the biggest cryo-injuries of the ZP.

IRODALOM

- Berthelot, F – Martinat-Botté, F – Locatelli, A – Perreau, C – Terqui, M (2000): Piglets born after vitrification of embryos using the Open Pulled Straw Method. *Cryobiol.* **41.**, 116–124.
- Carroll, J. – Depyere, H. – Matthews, C. D. (1990): Freeze-thaw induced changes of the zona pellucida explains decreased rate of fertilization in frozen-thawed mouse oocytes. *J. Reprod. Fertil.* **90.**, 547–553.
- Du, Y. – Pribenszky Cs. – Molnár M. – Zhang, X. – Yang, H. – Kuwayama, M. – Pedersen, A. M. – Villemoes, K. – Bolund, L. – Vajta G. (2008): High hydrostatic pressure: a new way to improve *in vitro* developmental competence of porcine matured oocytes after vitrification. *Reprod.* **135.**, 13–17.
- Dumoulin, J. C. – Bergers-Janssen, J. M. – Pieters, M.H – Enginsu, M. E. – Geraedts, J. P. – Evers, J. L. (1994): The protective effects of polymers in the cryopreservation of human and mouse zonae pellucidae and embryos. *Fertil. Steril.* **62.**, 793–798.
- Funahashi, H. – Ekwall, H. – Rodriguez-Martinez, H. (2000): Zona reaction in porcine oocytes fertilized *in vivo* and *in vitro* as seen with scanning electron microscopy. *Biol. Reprod.* **63.**, 1437–1442.
- Ghetler, Y. – Skutelsky, B. – Ben Nun, I. – Bendor, L. – Anihai, D. – Shalgi, R. (2006): Human oocyte cryopreservation and the fate of cortical granules. *Fertil. Steril.* **86.**, 2210–2216.
- Hagen, D. R. – Prather, R. S. – Sims, M. M. – First, N. L. (1991): Development of one-cell porcine embryos to the blastocyst stage in simple media. *J. Anim. Sci.* **69.**, 1147–1150.
- Isachenko, V. – Soler, C. – Isachenko, E. – Perez-Sanchez, F. (1998): Vitrification of immature porcine oocytes: effects of lipid droplets, temperature, cytoskeleton and addition and removal of cryoprotectant. *Cryobiol.* **36.**, 250–253.
- Kanyó K. – Konc J. – Cseh S. (2004): Az osztódási orsó állapotvizsgálatának jelentősége a petesejtek minőségvizsgálatában és az IVF-ET-kezelés hatékonyságának javításában. Első hazai tapasztalatok. *Magy. Nőorv. L.* **67.**, 73–79.
- Kasai, M. – Zhu, S. E. – Pedro, P. B. – Nakamura, K. – Sakurai, T. – Edashinge, K. (1996): Fracture damage of embryos and its prevention during vitrification and warming. *Cryobiol.* **33.**, 459–464.
- Kim, N. H. – Funahashi, H. – Abeydeera, L. R. – Moon, S. J. – Prather, R. S. – Day, B. N. (1997): Effects of oviductal fluid on sperm penetration and cortical granules exocytosis during fertilization of pig oocytes *in vitro*. *J. Reprod. Fertil. Dev.* **107.**, 79–86.
- Ko, C. S. – Ding, D. C. – Chu, T. W. – Chu, Y. N. – Chen, I. C. – Chen, W. H. – Wu, G. J. (2008): Changes to the meiotic spindle and zona pellucida of mature mouse oocytes following different cryopreservation methods. *Anim. Reprod. Sci.* **105.**, 272–282.
- Konc J. – Kanyó K. – Varga E. – Kriston R. – Cseh S. (2008): Oocyte cryopreservation: the birth of the first Hungarian babies from frozen oocytes. *J Assist. Reprod. Gen.* **25.**, 349–352.
- Mavrides, A. – Morrol, D. (2005): Cryopreservation of bovine oocytes: is cryoloop vitrification the future to preserving the female gamete? *Reprod. Nutr. Dev.* **42.**, 73–80.
- McCauley, T. C. – Buhí, W. C. – Wu, G. M. – Mao, J. – Caamano, J. N. – Didion, B. A. – Day, B. N. (2003): Oviduct specific glycoprotein modulates sperm-zona binding and improves efficiency of porcine fertilization *in vitro*. *Biol. Reprod.* **69.**, 828–834.
- Michelmann, H. W. – Rath, D. – Töpfer-Petersen, E. – Schwartz, P. (2007): Structural and functional events on the porcine zona pellucida during maturation, fertilization and embryonic development: a scanning electron microscopy analysis. *Reprod. Domest. Anim.* **42.**, 594–602.

- Petters, R. M. – Wells, K. D. (1993): Culture of pig embryos. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* **48.**, 61–73.
- Rojas, C. – Palomo, M. J. – Albarracín, J. L. – Mogas, T. (2004): Vitrification of immature and *in vitro* matured pig oocytes: study of distribution of chromosomes, microtubules, and actin microfilaments. *Cryobiol.* **49.**, 211–220.
- Romar, R. – Coy, P. – Gadea, J. – Rath, D. (2005): Effect of oviductal and cumulus cells on zona pellucida and cortical granules of porcine oocytes fertilized *in vitro* with epididymal spermatozoa. *Anim. Reprod. Sci.* **85.**, 287–300.
- Schiewe, M. C. – Rall, W. F. – Stuart, L. D. – Wildt, D. E. (1991): Analysis of cryoprotectant, cooling rate and *in situ* dilution using conventional freezing or vitrification for cryopreserving sheep embryos. *Therio.* **36.**, 279–293.
- Shi, L. Y. – Jin, H. F. – Kim, J. G. – Kumar, B. M. – Balasubramanian, S. – Choe, S. Y. – Rho, G. J. (2007): Ultra-structural changes and developmental potential of porcine oocytes following vitrification. *Anim. Reprod. Sci.* **100.**, 128–140.
- Silva, C. A. – Cabrera, L. M. – Hata, K. – Kuwayama, M. – Smith, G. D. (2005): Zona pellucida modifications and fertilization following metaphase II oocyte vitrification and warming. *Fertil. Steril.* **84.**, 381.
- Succu, S. – Leoni, G. G. – Berlingue, F. – Madeddu, M. – Bebbere, D. – Mossa, F. – Bogliolo, L. – Ledda, S. – Naitana, S. (2007a): Effect of vitrification solutions and cooling upon *in vitro* matured prepubertal ovine oocytes. *Therio.* **68.**, 107–114.
- Succu, S. – Leoni, G. G. – Berlingue, F. – Bogliolo, L. – Madeddu, M. – Bebbere, D. – Mossa, F. – Ledda, S. – Naitana, S. (2007b): Vitrification devices affect structural and molecular status of *in vitro* matured ovine oocytes. *Mol. Reprod. Dev.* **74.**, 1337–1344.
- Vajta, G. – Booth, P. J. – Holm, P. – Greve, T. – Callesen, H. (1997): Successful vitrification of early stage bovine *in vitro* produced embryos with the Open Pulled Straw (OPS) method. *Cryo-Lett.* **18.**, 191–195.
- Van den Abbeel, E. – Van Steirteghem, A. (2000): Zona pellucida damage to human embryos after cryopreservation and the consequences for their blastomere survival and *in vitro* viability. *Hum. Reprod.* **15.**, 373–378.
- Van Blerkom, J. – Davis, P. W. (1994): Cytogenetic, cellular, and developmental consequences of cryopreservation of immature and mature mouse and human oocytes. *Micr. Res. Techn.* **27.**, 165–193.
- Vincent, C. – Pickering, S. J. – Johnson, M. H. (1990): The hardening effects of dimethylsulphoxide on the mouse zona pellucida requires the presence of an oocytes and is associated with a reduction in the number of cortical granules present. *J. Reprod. Fertil.* **89.**, 253–260.
- Wu, G. M. – Lai, L. – Mao, J. – McCauley, T. C. – Caamaño, J. N. – Cantley, T. – Rieke, A. – Murphy, C. N. – Prather, R. S. – Didion, B. A. – Day, B. N. (2004): Birth of piglets by *in vitro* fertilization of zona-free porcine oocytes. *Therio.* **62.**, 1544–1556.
- Wu, C. – Rui, R. – Dai, J. – Zhang, C. – Ju, S. – Xie, B. – Lu, X. – Zheng, X. (2006): Effects of cryopreservation on the developmental competence, ultrastructure and cytoskeletal structure of porcine oocytes. *Mol. Reprod. Dev.* **73.**, 1454–1462.

A szerzők levélcíme – Address of the authors:

VARGA Erika – KISS Réka – TEMPFLI Károly – BALI PAPP Ágnes
Nyugat-magyarországi Egyetem
Mezőgazdaság- és Élelmiszertudományi Kar
Állattudományi Intézet
H-9200 Mosonmagyaróvár, Vár 2.
E-mail: evarga@mtk.nyme.hu, bali@mtk.nyme.hu

EGERSZEGI István – RÁTKY József
Állattenyésztési és Takarmányozási Kutatóintézet
H-2053 Herceghalom, Gesztenyés út 1.