

**Successful transfer of
in vitro produced frozen
bovine embryos with the
direct transfer technique
under farm conditions**
Short communication

B. Vincze^{1*}
L. Solti¹
L. Volman²
S. Cseh¹
Gy. Gyulay³

1. ÁTE Szülészeti Tanszék és
Haszonállat-gyógyászati Klinika,
1078 Budapest, István u. 2.

*e-mail: vincze.boglarka@univet.hu

2. Embrio Kft.
Bölcske

3. Embriobos Kft.
Martonvásár

SZARVASMARHA

Telepi körülmények között *in vitro* előállított és fagyasztott szarvasmarha-embriók sikeres átültetése az ún. direkt transzfer technikával

Rövid közlemény

Vincze Boglárka^{1*}, Solti László¹, Volman László², Cseh Sándor¹, Gyulay Gyula³

ÖSSZEFOGLALÁS

Az 1970-es évek óta intenzív kutatómunka folyik az *in vitro* embrió-előállítási rendszerek kialakítására szarvasmarha fajban. Az első, teljes egészében *in vitro* előállított borjak 1987-ben születtek Japánban, és 1996-ban hazánkban. A szerzők tudomása szerint Magyarországon jelen kísérlet az első, amelyben teljes egészében *in vitro* technológiával előállított embriókat, ún. direkt transzfer eljárással recipiensekbe beültetve sikeres vemhességeket értek el telepi körülmények között. Az ovum pick-up eljárással leszívott kumulusz-petesejt-komplexeket kereskedelmi forgalomban elérhető teljes tápfolyadék rendszerben érlelték, majd a megtermékenyítést követően a zigótákat *in vitro* tenyésztették, végül morfológiai bírálat után lassú fagyasztásos módszerrel mélyhűtve tárolták. A 62 fagyasztott embrióból 20 kitűnő minősítést kapott és recipiensekbe ültetve ezidáig 6 vemhességet diagnosztizáltak, amelyek közül az első borjú 2020. március 31-én született meg. Az eredmények alapján a jövőben az *in vitro* embrió-előállítás hazánkban is része lehet a tehenészeti telepek szaporodásbiológiai menedzsmentjének.

SUMMARY

Background: From the 1970's onwards, the establishment of bovine *in vitro* embryo production systems have been extensively studied. The first fully *in vitro* produced calves were born in 1987 in Japan. The first offspring from cryopreserved and *in vitro* produced ovine and bovine embryos born between 1994-1996 in Hungary. However, according to the authors' knowledge this is the first study describing fully *in vitro* produced (ovum pick up, *in vitro* matured, fertilised and cultured) embryos that have been frozen – thawed and transferred with the direct method resulting in successful pregnancies under farm conditions.

Objectives: To produce viable, and fully *in vitro* produced bovine embryos under farm conditions.

Materials and methods: After the ovum-pick up procedure, the cumulus-oocyte-complexes have been matured, fertilized and the zygotes cultured *in vitro* using a commercially available and ready-to-use bovine media suite. Cryopreservation has been performed through a commercial slow freezing protocol. After thawing, the embryos have been transferred directly into synchronized recipients. Pregnancy diagnosis were carried out by ultrasonography on day 32th and confirmed by rectal palpation on day 60th of pregnancy.

Results and discussion: Out of the 62 freezable *in vitro* produced embryos, 20 excellent quality ones have been frozen-thawed and transferred directly into synchronized recipients and 6 pregnancies have been achieved so far. The first heifer calf was born healthy on 31st March, 2020. Until now, 6 calves have been born from this program. The present results indicate that *in vitro* produced bovine embryos could contribute to the advanced reproductive management in beef and dairy operations in Hungary.

A latin nyelvben az *in vitro* jelentése „üvegben”, és az *in vitro* fertilizáció (IVF) kifejezést gyakran használják általános megjelölésként, amikor olyan embriókról tesznek említést, amelyeket a testen kívül állítottak elő (13). Tágabb értelmezésben azonban az IVF kifejezés magában foglalja a petefészkekből kinyert petesejtek *in vitro* érlelését (*in vitro* maturation, IVM), azok *in vitro* termékenyítését (*in vitro* fertilization, IVF), majd ezt követően az *in vitro* tenyésztését (*in vitro* culturing, IVC) is. Ezek az eljárások összefoglalóan adják ki a teljes mértékben *in vitro* előállított (*in vitro* produced; IVP) embriók létrehozását, vagyis az IVMFC (*in vitro* maturation, fertilization and culture) embriókat.

Először 1959-ben nyúlban állítottak elő életképes utódot teljes mértékben *in vitro*

Az első, élő IVF-borjú 1981-ben született meg

Hazánkban az első IVF-borjú születéséről 1991-ben jelent meg közlemény

Először 1959-ben nyúlban állítottak elő életképes utódot teljes mértékben *in vitro* (13), ezt követte 1968-ban az egér (13). Mivel az egér nem bizonyult megfelelő IVF-modellnek a szarvasmarha fajban, az első sikeres szarvasmarha-IVF 1977-ben történt, amikor bikaspermiumokat kapacitáltak nyúlpetevezetőben (13). Az első élő IVF-borjú, az *in vitro* termékenyítést követően, 4-sejtes stádiumú embrió recipiensbe ültetését követően született 1981-ben (1). Teljesen *in vitro* előállított borjak először 1987-ben születtek meg egy japán kutatócsoport munkáját követően (12).

A kezdetek óta eltelt időben az eljárás eredményessége nagymértékben javult (13). Az elmúlt évtizedekben szarvasmarhában használható *in vitro* technikákat olyan szintre fejlesztették, hogy ma már szinte az összes országban rutinszerűen elő tudnak állítani IVF-borjakat (13). A kereskedelmi forgalomban gyári oldatsoportokat vásárolhatunk, amelyek a petesejtleszívás (ovum pick-up, OPU) folyamattól, a petesejtek érlelésén, termékenyítésén át az embriók tenyésztéséig és beültetéséig jó eredményességgel alkalmazhatók. A fertőző betegségek átvitele szempontjából aggályos, de korábban elkerülhetetlen állati eredetű összetevők (pl. BSA [bovin szérum albumin] vagy foetalis borjúsavó [FCS]) nélküli oldatok is megjelentek, így elérve a hosszabb és könnyebb eltarthatóságot (ezeket nem szükséges hűteni). Ráadásul így a fertőzésveszély is minimálisra csökkenthető, vagy teljesen kiküszöbölhető.

Magyarországon, kapcsolódva a nemzetközi tudományos irányhoz, több munkacsoport együttes közreműködésével születtek eredmények az *in vitro* embrió-előállítás terén az 1980-as és '90-es években (2-11, 17-21, 23-25). A Magyar Állatorvosok Lapja hasábjain szarvasmarha IVF-ről először 1989-ben számoltak be (16), az első sikeres vemhességet valamivel később közölték (23). Ezt követően több dolgozat született, amelyben a technikát a veszélyeztetett magyar szürke szarvasmarha génmegőrzésére használták (20, 21, 25). Az *in vitro* fertilizáció módszerének részletes magyar nyelvű leírása az állattenyésztő közvélemény számára 1992-ben jelent meg (24).

Később részben (IVM, IVF), vagy teljes egészében (IVP) laboratóriumban előállított borjak (3, 5, 6) születtek magyar kutatás eredményeként, ill. jelentős előrehaladás történt az embriók tartós tárolásában (10, 11). Bár az ún. második generációs asszisztált reprodukciós technikák (ide sorolható az IVF) potenciális lehetőségeit és korlátait elemző tanulmány jelent meg (19), azonban Magyarországon a technológia mostanáig nem került át a mindennapos gyakorlatba: az embrió-előállítás az intézeti laboratóriumok falai között maradt. Üzemi körülmények között nem születtek tudományos közleményben megjelent eredmények. Ugyanakkor a felhasználók, az állattenyésztő kollegák részére a Magyar Mezőgazdaságban megjelent egy dolgozat, amiben a módszer alkalmazásának előnyeit foglalták össze, egy konkrét IVF program tapasztalatai alapján (6). Egy Holstein-Fríz tehenészet egyik nagy genetikai értéket képviselő tehenét technológiai okokból selejtezni kellett, amit előre tervezhető módon tudtak megtenni. Ez lehetővé tette, hogy a vágóhídról a laboratóriumba szállítsák a petefészkeket

és kinyerjék a petesejteket. Ezt követően célpárosítással kijelölt bika spermájával *in vitro* termékenyítették azokat. Az *in vitro* előállított embriókat recipiensekbe ültetve az értékes genetikájú petesejtdonor-tehéntől levágása után még több borjú is született (5, 6).

Jelen dolgozat célja, hogy a szerzők bemutassák az első hazai, OPU-IVM-IVF-IVC folyamatával telepi körülmények között előállított, programozott fagyasztással mélyhűtött, majd felolvasztás után direkt technikával beültetett szarvasmarha-embriókkal elért fogamzási eredményeket.

SAJÁT VIZSGÁLATOK

ANYAG ÉS MÓDSZER

Az IV-embriók előállításához hús típusú Blonde d'Aquitaine tehének petefészkeit használtuk; a petesejtek egy részét élő állatból, OPU-eljárással nyertük ki, majd a petefészkeket *per vaginam* sebészileg eltávolítottuk. A martonvásári telepi embrió-laboratóriumban (Embriobos Kft., Gábor major, Martonvásár) történt a petesejtek, ún. kumulusz-petesejt-komplexek (COC) formájában történő, leszívása a tüszőkből, OPU-módszerrel (13).

A petesejtek (COC) *in vitro* érleléséhez, termékenyítéséhez, tenyésztéséhez az IVF Bioscience Ltd. (IVF Limited T/A IVF Bioscience, Bickland Industrial Park, Falmouth, Cornwall, UK) BOVINE MEDIA tápoldat sorozatát használtuk. Az egyes lépéseket a gyártó utasításai szerint végeztük el. A főbb lépések röviden összefoglalva:

1. Petesejtek kinyerése, OPU (-1. nap)
2. Petesejtek mosása, majd érlelése (IVM) 21–24 órán át
3. *In vitro* termékenyítés, IVF (0. nap)
4. *In vitro* tenyésztés, IVC (1–7. nap)
5. Embrióbírálát az IETS (International Embryo Technology Society) protokoll szerint
6. Embriófagyasztás

EMBRIÓFAGYASZTÁS

A 7 napos IVF-embriókat az ún. lassú fagyasztási módszerrel mélyhűtöttük, amely egylépcsős felolvasztást és közvetlen (direkt) beültetést tesz lehetővé. A fagyasztás programozott hűtőberendezés (Freeze Control Model CL5500, Cryologic PTY LTD, Ausztrália) segítségével történt, a gyártó ajánlása szerint. A rendszer szacharóz és etilén-glikol alapú fagyasztó oldatot és egy fajspecifikus transzfermédiát (BO-TRANSFER medium, Eggtech Ltd., Egyesült Királyság) használ.

EMBRIÓBEÜLTETÉS, VEMHESSEGVIZSGÁLAT

A 62 lefagyasztott IVF-embrióból 20-at felolvasztás után recipiensekbe ültettünk manuálisan az ún. direkt, vértelen embrióbeültetés módszere szerint, amely lehetővé teszi, hogy felolvasztást követően az embriót közvetlenül, a tárolásra használt műszalmával ültessük be (15, 26). A recipiensek vemhességét ultrahangvizsgálattal a 32. napon állapítottuk meg és a 60. napon végzett rektális tapintással erősítettük meg. A statisztikai elemzéseket az R-program segítségével végeztük el (14).

Az embriók előállításához hús típusú Blonde d'Aquitaine tehének petefészkeit használták

A 7 napos IVF-embriókat az ún. lassú fagyasztási módszerrel mélyhűtötték

A 62 lefagyasztott IVF-embrióból 20-at felolvasztás után recipiensekbe ültettek

EREDMÉNYEK

A 20 beültetett embrióból 6 borjú született

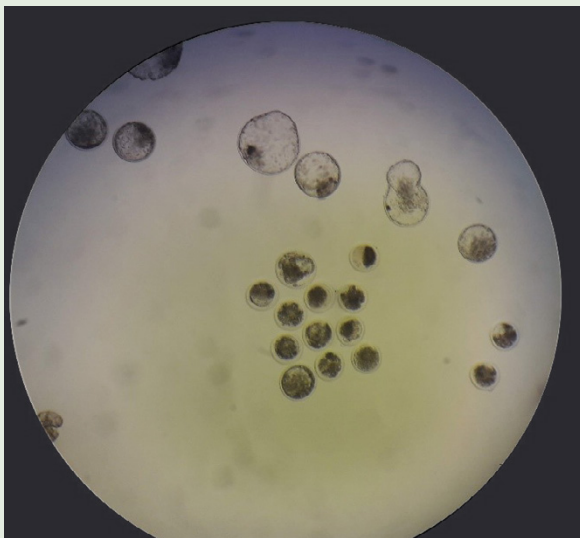
A 4 IVF-programból összesen 62 fagyasztható minőségű szarvasmarha-embriót állítottunk elő. Ezekből az *in vitro* laboratóriumi tenyésztés során 6 kompakt morula, 5 korai blasztociszta, 9 blasztociszta, 40 érett blasztociszta és 2 expandált blasztociszta fejlődött (1. ábra). Minőségüket tekintve 62% kiváló (IETS 1), 27% jó (IETS 2) és 11% közepes (IETS 3) volt. Szignifikáns korreláció volt az embriók bírálati pontszáma (minőség) és fejlődési stádiuma között; Pearson-féle korrelációval ($\text{corr} = -0,458$, $p < 0,0001$), vagyis az előrehaladottabb fejlettségű embriók morfológiailag jobb minőségűnek bizonyultak.

A folyékony nitrogénben tárolt embriók közül felengedés után 20-at recipiensekbe ültetve az összefoglaló készítésének időpontjában 6 állat vemhessége volt megállapítható (6/20; 30%).

Az első, teljesen IVF-fel előállított, majd fagyasztott és felolvasztás után közvetlenül beültetett embriókkal elért vemhességekből 2020. március 31.-én született meg az első egészséges üszőborjú a Tejút Kft. kesztölci telepén (2. ábra). Ebből a programból összesen 6 IVF-borjú született, egyikük azonban farfekvés miatt elléskor elhullott. A másik öt egyed él, ezek az állatok 1 hét – 4 hónap közötti korúak a kézirat készítésekor.

MEGVITATÁS

A javuló eredményességű biotechnológiai eljárások ellenére a magyar szakembereknek csak kis része foglalkozott mélyebben az *in vitro* technikák elsajátításával, ennek egyik oka, hogy a laboratóriumi eszközökhöz még mindig drágán lehet hozzájutni. A technológiák egyszerűsödésével azonban szélesebb körben van és lesz lehetőség a tenyésztők számára is, hogy éljenek az asszisztált reprodukció e speciális, hazánkban még nem mindennapos, állománybővítési lehetőségével.



1. ÁBRA. Különböző fejlődési stádiumú IVF-szarvasmarhaembriók mikroszkópos képe (natív, 80×)



2. ÁBRA. Az elsőként világra jött, egészséges IVP-üszőborjú a Tejút Kft. kesztölci telepén

FIGURE 1. Microscopic image of IVF bovine embryos in different developmental stages (native, 80×)

FIGURE 2. The first, fully *in vitro* produced newborn heifer calf at the farm of Tejút Ltd., (Keszthely, Hungary)

**Az in vitro technika
hatékonyan alkalmaz-
ható hazai állományok
emelt szintű szaporodás-
biológiai menedzsment-
jének részeként**

Jelen vizsgálatban két cég együttműködésével (Embriobos Kft. és Embrió Kft.) sikerült telepi körülmények között létrehozni olyan szarvasmarha-embriókat, amelyek recipiensbe ültetése vemhességeket, majd ezidáig hat életképes borjú megszületését eredményezte, ezzel is bizonyítva, hogy az *in vitro* technika hatékonyan alkalmazható nemcsak a külföldi, hanem a hazai állományok emelt szintű szaporodásbiológiai menedzsmentjének részeként.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönetünket szeretnénk kifejezni a sok segítségért GYULAY RÉKÁNAK és GYULAY BENEDEKNEK. Az IVF-médiumok beszerzéséért és rendelkezésünkre bocsátásáért köszönettel tartozunk az Alpha-Vet Kft. munkatársainak. Köszönjük továbbá Bodó SZILÁRDNAK, hogy tanácsaival segítette a projekt sikerét.

IRODALOM

- BRACKETT, B. G. – BOUSQUET, D. et al.: Normal development following *in vitro* fertilization in the cow. *Biol. Reprod.*, 1982. 27. 147–158.
- CSEH, S. – KREYSING, U. et al.: Direct rehydration of IVM, IVF and IVC bovine embryos frozen in ethylene-glycol. *Theriogenology*, 1995. 43. 190.
- CSEH S. – KREYSING U. – LUCAS HAHN, A – NIEMANN H. – TREUER Á.: *In vitro* fertilizációval előállított szarvasmarha-embriók mélyhűtése (Deep-freezing of bovine embryos derived from *in vitro* fertilization (IVF)). *Magy. Állatorvosok Lapja*, 1996. 51. 69–71.
- CSEH S. – GYULAY GY. – SOÓS P.: Ivarzásindukálás és szinkronizálás szintetikus gesztagént tartalmazó fülimplantátummal / Induction and synchronisation of estrus by an ear implant containing synthetic gestagene. *Magy. Állatorvosok Lapja*, 1983. 38. 43–44.
- CSEH, S. – SEREGI, J. – SOLTÍ, L.: Practical experiences with direct transferred frozen embryos. *Theriogenology*, 1994. 41. 185.
- CSEH S. – SEREGI J. – TREUER Á. – BARTYIK J. – PORVAY M.: Lombikbébi születik. *Magyar Mezőgazdaság*, 1994. 49:42. 10–11.
- CSEH S. – TREUER Á. – BESENFELDER U. – BREM G. – BÉNYEI B. – SEREGI J.: *In vitro* fertilizációval (IVF) előállított juhembriók sikeres átültetése. Előzetes közlemény. [Successful implantation of ovine embryos derived from *in vitro* fertilization (IVF). Preliminary report.] *Magy. Állatorvosok Lapja*, 1995. 50. 829–831.
- CSEH S. – KREYSING U. – LUCAS HAHN A. – NIEMANN H. – TREUER Á.: *In vitro* fertilizációval előállított szarvasmarha embriók mélyhűtése: Deep-freezing of bovine embryos derived from *in vitro* fertilization (IVF). *Magy. Állatorvosok Lapja*, 1996. 51. 69–71.
- DINNYÉS, A. – BODÓ, SZ. – SENAN, G. – SOLTÍ, L.: *In vitro* survival of cryopreserved hatching or hatched *in vitro* produced (IVP) bovine embryos. *Theriogenology*, 1996. 45. 173.
- DINNYÉS, A. – CAROLAN, C. – LONERGAN, P. – SOLTÍ, L. – MASSIP, A. – MERMILLOD, P.: *In vitro* survival of *in vitro* produced (IVP) bovine embryos frozen or vitrified by techniques suitable for direct transfer. *Theriogenology*, 1995. 43. 197.
- DINNYÉS, A. – KEEFER, C. L. – STICE, S. – SOLTÍ, L. – VAJTA, G. – MACHÁTY, Z. – RALL, W. F.: Vitrification of IVMFC bovine embryos in VS3a and EFS solution: a preliminary report. *Theriogenology*, 1994. 41. 189.
- FUKUDA, Y. – ICHIKAWA, M. et al.: Births of normal calves resulting from bovine oocytes matured, fertilized and cultured with cumulus cells *in vitro* up to the blastocyst stage. *Biol. Reprod.*, 1990. 42. 114–119.
- NIEMANN, H. – WRENZICKY, C. (Eds). *Animal Biotechnology*, 1. Springer, Cham 2018.
- R Core Team. A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. 2017.ed. URL <https://www.R-project.org/>
- ROWE, R. F. – DEL CAMPO, M. R. et al.: Embryo transfer in cattle: interactions. *Theriogenology*, 1981. 15. 43–56.
- SHELLANDER, K. – SHELLANDER, E. – FÜHRER, F. – HAUSER, C. – SCHLEGER, W. – SEREGI J. – PÉLI J. – TREUER Á. – SOLTÍ L. – HARASZTI J. – SZÁSZ F. – BÉNYEI B. – TÖRÖK M.: Szarvasmarha petesejtek *in vitro* termékenyítése. *Magy. Állatorvosok Lapja*, 1989. 44. 561–563.
- SEREGI, J. – CSEH, S. – TREUER, Á.: The first successful transfer of frozen embryos derived from IVMFC of bovine oocytes in Hungary. *Theriogenology*, 1995. 43. 321.
- SEREGI J. – TREUER Á. – CSEH S.: *In vitro* fertilizációval (IVF) előállított, mélyhűtött szarvasmarha-embriók sikeres átültetése. Előzetes közlemény/Successful transfer of deep-frozen embryos, produced by *in vitro* fertilization of cow-preliminary communication. *Magy. Állatorvosok Lapja*, 1994. 49. 523–525.
- SOLTÍ L.: A szaporodásbiológia lehetőségei és korlátai – érvek és ellenérvek. *Magy. Állatorvosok Lapja*, 2012. 134. 119–125.
- SOLTÍ, L. – VARGA, ZS. – BÁRÁNDI, ZS. – VAJTA, G. – MACHÁTY, Z. – CSEH, S.: IVF embryos from endangered Hungarian Grey cattle population. *Assisted Reproductive Technology/Andrology*, 1991. 2. 104.
- SOLTÍ, L. – MACHÁTY, Z. – BÁRÁNDI, ZS. – TÖRÖK, M. – VAJTA, G.: IVF embryos of known parental origin from the endangered Hungarian Grey cattle breed. *Theriogenology*, 1992. 37. 301.
- STRINGFELLOW, D. A. – GIVENS, M. D. (eds): *Manual of the international embryo transfer society*, 4th ed., Savoy, IL. 2018.
- VAJTA G. – BÁRÁNDI ZS. – VARGA ZS. – MACHÁTY Z. – CSEH S. – SZÁSZ F. – SOLTÍ L.: Vemhesség *in vitro* fertilizált szarvasmarha-petesejtből. *Magy. Állatorvosok Lapja*, 1991. 46. 87–90.
- VAJTA, G. – SOLTÍ, L.: *In vitro* fertilizáció: új eljárás a szarvasmarhatenyésztésben. *Állattenyésztés és Takarmányozás*, 1992. 41. 49–56.
- VARGA, ZS. – BÁRÁNDI, ZS. – MACHÁTY, Z. – SOLTÍ, L. – CSEH, S. – SEREGI, J. – CSÁKI, T. – VAJTA, G.: *In vitro* fertilization in Hungarian Grey Cattle. *Reprod. Domest. Anim.*, 1993. 28. 252–257.
- WRIGHT, J. M.: Non-surgical embryo transfer in cattle embryo-recipient: Nonsurgical transfer. *Am. J. Vet. Res.*, 1980. 41. 1024–1028.

Közlésre ér.: 2020. aug. 5.