

Doktori (PhD) értekezés tézisei

Sztán Nikoletta

Gödöllő

2022



MAGYAR AGRÁR- ÉS
ÉLETTUDOMÁNYI EGYETEM
SZENT ISTVÁN CAMPUS

Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem

***IN VITRO* GÉNMEGŐRZÉSI MÓDSZEREK
FEJLESZTÉSE LÚD (*ANSER ANSER DOMESTICA*)
FAJBAN KORAI EMBRIONÁLIS SEJTEK
FELHASZNÁLÁSÁVAL.**

Sztán Nikoletta

Gödöllő

2022

A doktori iskola

Megnevezése: Állatbiotechnológiai és Állattudományi Doktori Iskola

Tudományága: Állattenyésztési tudományok

Vezetője: Prof. Dr. Mézes Miklós

egyetemi tanár, az MTA rendes tagja

Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem

Élettani és Takarmányozástani Intézet, Takarmánybiztonsági Tanszék

Témavezető:

Dr. Várkonyi Eszter CSc.

tudományos főmunkatárs

Nemzeti Biodiverzitás- és Génmegőrzési Központ

Haszonállat-génmegőrzési Intézet

Társtémavezető:

Dr. Hidas András CSc.

tudományos főmunkatárs

Nemzeti Biodiverzitás- és Génmegőrzési Központ

Haszonállat-génmegőrzési Intézet

.....
Az iskolavezető
jóváhagyása

.....
Témavezető jóváhagyása
Dr. Várkonyi Eszter CSc.

.....
Társtémavezető
jóváhagyása
Dr. Hidas András CSc.

1. A MUNKA ELŐZMÉNYEI, CÉLKITŰZÉSEK

1.1. A munka előzményei

Bolygónk népessége az elmúlt évtizedekben is jelentősen növekedett. 2021-ben megközelítette a 7,8 milliárdot, míg ez a szám 2000-ben még csak 6,1 milliárd fő volt. Ez a nagyarányú népességnövekedés az emberiség növekvő terület- és élelmiszerigényére is hatással van. Az állati termékelőállítás növelésére irányuló intenzív szelekció és a minél nagyobb húskihozatalt célzó keresztezési programok a baromfityénységben is a génállomány eróziójához vezettek (*Bessei, 1989*). A genetikai diverzitás csökkenése globális jelenség, melynek egyik sajnálatos oldala, hogy az intenzív fajták térhódításával háttérbe szorulnak az őshonos – többek között baromfi – fajok/fajták is.

Az értékes, ritka allélok elvesztésének és a genetikai diverzitás beszűkülésének megakadályozására több lehetséges megoldás is rendelkezésünkre áll. Az *in situ, in vivo* génmegőrzés során az adott fajt/fajta az eredeti élőhelyén, az *ex situ, in vivo* génmegőrzés keretében pedig az állatokat az eredeti élőhelyüktől eltérő területeken, farmokon, állatkertekben, nukleusz populációkban gondozzák és szaporítják. A Nemzeti Biodiverzitás- és Génmegőrzési Központ Haszonállat-génmegőrzési Intézetében (NBGK-HGI) már a 1950-es évektől kezdve megtalálhatóak az őshonos magyar baromfi és víziszárnyas fajok és fajták (*Biszkup and Beke, 1951; Báldy, 1954*), mint élő génbanki állományok. Az élő állományok fenntartása esetén azonban ezek számos veszélynek vannak kitéve. Emiatt önmagukban az értékes populációk biztonságos hosszútávú megőrzésére ezek a módszerek nem alkalmasak. Ezért szükséges az *ex situ, in vitro* génbankok kialakítása, fenntartása is, ahol az ezen állományokból származó ritka, értékes genetikai anyagot hordozó hím- és nőivarsejteket, embriókat, embrionális sejteket/szöveteket, illetve korai ivarszervszöveteket és DNS mintákat mélyhűtött állapotban, hosszú távon képesek vagyunk megőrizni.

Hazánkban a lúdtenyésztés és -tartás tradicionálisan fontos mezőgazdasági ágazat, ezért szükséges volt egy egyszerűen alkalmazható, hatékony génmegőrzési eljárás kidolgozása mind az őshonos, mind az értékes genetikai anyaggal rendelkező kereskedelmi vonalak tekintetében. Fontos szempont volt, hogy a madaraknál a nőivar a heterogametikus, így a W kromoszóma, valamint a mitokondriális DNS genetikai anyaga csak a nőivar génmegőrzésbe történő bevonásával oldható meg. Erre madarak esetében megoldást kínál a különböző típusú őssejtek tárolása, majd azok recipiens egyedekbe történő beültetésével ivarszervi kiméra egyedek létrehozása. Ezen egyedek egymással, vagy a donor fajtaival történő visszakeresztezésével visszanyerhető a kívánt genotípus. Mivel a lúd faj több szempontból is problémás kísérleti állat, ezért nagyon kevés kutatási eredmény található a vonatkozásában.

1.2. Célkitűzések

A házityúk fajban az ősvarsejtek izolálása és hosszú távú fenntartása sejttenyészetben már kidolgozott (*Van de Lavoir et al. 2006; Whyte et al. 2015; Tonus et al. 2016*). Ez utat nyitott az ősvarsejtekkel történő különböző manipulációk felé néhány madárfajban; pl. a PG sejtek a recipiens embriók keringési rendszerébe visszainjektálva képesek a gonádokba vándorolni (*Yasuda et al. 1992*) és ott ivarsejttekké érni (*Ono et al. 1998; Tajima et al. 1993*). Azonban a sejtvonalak fenntartásához szükséges tápoldatok fajspecifikusak, továbbá az ősvarsejtek donor embrióból való kinyerésének, tisztításának és felsokszorosításának nagy az infrastruktúra- és a képzett humánereforrás-igénye, ami nem minden laboratóriumban áll rendelkezésre. Ezért a legtöbb baromfi és víziszárnyas fajnál áthidaló megoldás kidolgozása vált szükségessé. Sajnálatos módon a blasztodermális eredetű őssejtek nagyon korai embrióba (X. stádium) történő injektálásának kisebb a hatékonysága az ivarszervi kiméra-előállítását illetően, ezért a két módszert ötvözve elsődleges célom volt, hogy kidolgozzak egy új technikát, mely szerint blasztodermális sejtuszpenziót injektálok 3 napos lúdembrió (HH14-17) véráramába abban az időszakban, amikor az ősvarsejtek vándorlása történik az embrionális ivarszervekbe. Abból indultam ki, hogy már a korai embrionális őssejtek között is található ősvarsejtek, amelyeket a megfelelő időszakban az embrióba juttatva azok elvándorolnak a rendeltetési helyükre, így növelve az ivarszervi kimérák arányát (*Patakiné et al. 2017*).

Munkám során az alábbi célokat határoztam meg:

- Pontosban behatárolni a lúd embriófejlődésének azt az időszakát, amikor az ősvarsejtek vándorolnak az embrióban (HH14-17).
- Immunfestéssel bizonyítani, hogy a blasztodermális sejtuszpenzió valóban tartalmaz ősvarsejteket, valamint, hogy a megfelelő fejlettségű lúdembrió véráramában valóban vándorolnak a PG sejtek.
- Megvizsgálni az injektálási módszer embriófejlődésre gyakorolt káros hatásait.
- Az elhalt embriókon és a kikelt naposlibákon mikroszatellit marker analízis segítségével megállapítani, hogy a recipiens embrióban/kislibában jelen vannak-e a donor sejtek, illetve hol helyezkednek el.
- Végül pedig annak a vizsgálata, hogy a keltetés hányadik órájában végzett injektálás a leghatékonyabb a kiméra előállítás szempontjából.

2. ANYAG ÉS MÓDSZER

2.1. A lúd szülőpár csoportok kialakítása mikroszatellit-marker vizsgálatok alapján

A recipiens egyedekben jelenlévő donor sejtek kimutatására mikroszatellit markerek állnak rendelkezésünkre (*Zhou és Lamont, 1999*). Olyan egyedeket választottam ki az egyes családok kialakításához, melyek az általam kiválasztott lúd-specifikus mikroszatellit marker, a Bcau3 (*Buchholz et al. 1998*) esetében különböző allélokkal rendelkeznek homozigóta formában.

144 állat szárnyvénájából vettem 500-700 µl mennyiségű vért nátrium-citrátot tartalmazó 1,5 µl-es eppendorf csőbe. A vérmintákból hagyományos kisózásos módszerrel (*Miller et al. 1988*) DNS-t izoláltam. A szárított DNS-t 50 µl desztillált vízben 37°C-on egy éjszakán keresztül visszaoldottam. A minták DNS koncentrációjának lemerését követően equalizáltam a vizsgálatokhoz a mintákat a szükséges 5 ng/µl -re, majd a genotípus megállapításának elvégzéséig -20°C-on tároltam azokat. A PCR-termékeket CY5-el fluoreszcensen jelölt primerek alkalmazásával állítottam elő és poliakrilamid gélen vizualizáltam Alf Express II automata DNS-analizáló készülék segítségével.

A kapott eredmények alapján alakítottam ki a donor és a recipiens kísérleti csoportot. A donor állomány kiválasztott 28 egyede a **155bp** hosszúságú allélt hordozta homozigóta formában, míg a recipiens állomány kiválasztott 35 egyede egy másik, a **159bp** hosszúságú alléllal rendelkezett szintén homozigóta formában.

2.2. A magyar lúd embriófejlődési stádiumainak meghatározása

A lúd embrionális sejtek injektálásához először meg kellett határoznom az embrió fejlődésének azt a szakaszát, amikor az ősvarsejtek vándorlása történik. Házityúknál az embrió ezt a fejlődési stádiumot 52-58 óra (HH13-16) inkubálás után éri el. Mivel azonban a házilúd embrionális fejlődése 29-31 napig tart, szemben a tyúkével, amely csak 21 nap, vizsgálnom kellett, hogy a lúdembrió fejlettsége mikor éri el az injektáláshoz szükséges HH14-16 fejlődési stádiumot. Erre vonatkozóan nem volt adat a szakirodalomban.

A frissen tojt magyar lúd tojásokat 0,25%-os hypochlorit oldattal lemostam, majd a faj igényeihez igazodva 37,7°C-on, 70%-os páratartalom mellett, óránkénti 90°-os forgatással inkubáltam PL Machine MIDI F500S keltetőgépben.

A keltetés 60. órájától kezdve a 89. óráig 10 percenként kivettem egy tojást a keltetőgépből, a laterális oldalon középen tojástörő csipesz segítségével ablakot nyitottam, majd a héjhártya eltávolítása után Leica Axioscope sztereómikroszkóp segítségével megvizsgáltam a fejlődő embriót. A részletek alaposabb megfigyelhetősége miatt az embrió alá Fast Green festéket injektáltam. A vizsgálat alapján meghatároztam a lúd embriók fejlődési stádiumait, a *Hamburger & Hamilton* által kidolgozott (1951) házityúk fejlődési stádiumokat alapul véve. Feljegyeztem az inkubáció hosszát és az embrió fejlettségi stádiumát. A kapott adatokat egy adatbázisban foglaltam össze és fotó dokumentációt készítettem. Összesen 745 lúdembriót vizsgáltam meg.

2.3. Az ősvarsejtek fluoreszcens immunfestése egész lúd embrióban

A HH16-os fejlettségi stádiumú lúdembriókat szűrőpapír gyűrű segítségével eltávolítottam a szik felületéről. Lemostam foszfát puffertelt fiziológiás sóoldatban (PBS), majd fixáltam 4%-os paraformaldehidet (PFA) tartalmazó PBS oldatban egy éjszakán keresztül 4°C-on. Ezt követően az embriókat 3 alkalommal rázóasztalon 0,01% szarvasmarha szérum albumint /BSA/ tartalmazó PBS oldatban, alkalmanként 30 perc időtartamig mostam. Az embriókat 1% BSA-t és 0,1% Triton-X-100-at tartalmazó PBS oldattal permeabilizáltam egy éjszakán keresztül 4°C-on. Ezután szintén 4°C-on az embriót anti-CVH elsődleges antitesttel 1:100-as hígítást alkalmazva 0,1% BSA-t tartalmazó PBS oldatban egy éjszakán keresztül inkubáltam. Másnap 3 alkalommal egymás után alkalmanként 30 percig rázótermosztátban mostam a mintát 0,01% BSA-t tartalmazó PBS oldatban szobahőmérsékleten, majd a mintákat fluoreszcein izotiocianát (FITC, 1:500) másodlagos antitesttel inkubáltam 0,1% BSA-t tartalmazó PBS oldatban egész éjszakán keresztül 4°C-on. Ezután két, egyenként 30 perces, szobahőmérsékleten elvégzett mosás következett 0,01% BSA-t tartalmazó PBS oldatban. A sejtmagfestést sötétkamrában, szobahőmérsékleten, 15 perc időtartamig végeztem 1 µM TO-PRO™-3 használatával PBS oldatban. Ezt háromszori, 30 perc időtartamú PBS-ben történő mosás követte. A mintákat a mikroszkópos vizsgálatig 0,01%-os BSA-PBS-ben tároltam, 4°C-on.

A fotózáshoz a mintákat tárgylemezre helyeztem, majd fedőlemez és Vectashield fedőoldat segítségével fedtem le, ezt követően a mintákat konfokális mikroszkóp segítségével vizsgáltam.

2.4. Lúd blasztodermális sejtszuszpenzió immunfestése ősivarsejt-specifikus markerekkel

A 2.6. alfejezetben részletezett módon izolált blasztodermális sejteket szuszpendáltam PBS oldatban, majd 10 percig fixáltam 4%-os PFA oldatban 4°C-on. Háromszori, - alkalmanként 5-5 perc időtartamú - 0,01% BSA tartalmú PBS oldatban történő mosást követően a sejteket 0,1% Triton-X-100, valamint 2,5% számár szérum tartalmú PBS segítségével blokkoltam 45 percig, szobahőmérsékleten. Ezután pára kamrában 4°C-on inkubáltam a sejteket egész éjszakán át 1:100 hígítású anti-CVH elsődleges antitesttel. Az inkubációt követően három alkalommal mostam a mintákat 5-5 percig 0,01% BSA tartalmú PBS oldattal. Ezután IgG FITC másodlagos antitesttel inkubáltam a sejteket sötét pára kamrában 37°C-on, 1 órán keresztül, majd 0,01% BSA tartalmú PBS oldattal való mosást követően a sejtmagokat TO-PRO™-3 festékkel festettem. A tárgylemezeket fedőlemez és 10 µl Vectashield fedőoldat segítségével fedtem le, majd mintákat konfokális mikroszkóp segítségével vizsgáltam.

2.5. A recipiens tojások kezelése injektálás előtt

Heti egy alkalommal 30 db recipiens tojást helyeztem a keltetőgépbe. A lúdtojásokat a fajnak megfelelő körülményeket biztosítva inkubáltam. A recipiens tojások injektálását 72 órás inkubációs idő elteltével kezdtem meg.

2.6. A donor blasztodermális sejtek kinyerése

A kísérlet során injektálásra használt donor eredetű blasztodermális sejteket a donor családtól származó, frissen tojt, inkubálatlan, termékeny tojásokból nyertem.

A tojásokat felhasználásig, de maximum 4 napig 16-18°C-os tojástároló helységben tároltam. Egy injektálási kísérlethez 14-16 tojás csírákorongjából nyertem ki a sejteket. A tojásokat a fertőzésveszély elkerülése érdekében először 70%-os etanollal áttöröltem, majd óvatosan feltörtem. A termékeny tojások csírákorongjára egy steril szűrőpapír gyűrűt helyeztem, melyet, miután kellően a perivitellin membránhoz tapadt, ollóval körbevágtam, és az eltávolított membrándarabról a blasztodermális sejteket DMEM „high glucose” tápoldattal steril fecskendő és tű segítségével steril centrifugacsőbe lemostam. Az összegyűjtött sejteket pipetta segítségével a tápoldatban óvatosan felszuszpendáltam, majd 7 percig 2300 rpm-en, 4°C-on centrifugáltam. A sejteket a csapadék felső rétegéből óvatosan leszívtam, majd 2,5 ml steril DMEM tápoldatban újraszuszpendáltam. A törmelékek és a szik minél hatékonyabb eltávolítása érdekében ezt a lépést még egyszer megismétltem.

A második centrifugálást követően a felülúszó nagy része eltávolításra került, mindössze 0,5 ml, a sejteket is tartalmazó médiumot hagytam meg. A sejtek életképességének vizsgálatát Chicago Sky Blue élő-holt festéssel (*Kútvölgyi et al, 2006*), Makler-kamra segítségével történő számlálással határoztam meg. A kész sejtszuspenziót 10 μ l Fast Green festékkel festettem meg, majd felhasználásig termosztátban tároltam 37°C-on.

2.7. Donor korai embrionális sejtek injektálása 3 napos recipiens lúdembrióba

A keltetőgépből 72 óra keltetés után egyesével elkezdtem kivenni a recipiens tojásokat. A tojás laterális oldalán, illetve a tompa végén a fertőzések megelőzése céljából betadine oldatos fertőtlenítést végeztem. A légkamra felőli oldalon egy hegyes csipesszel 1mm átmérőjű lyukat ütöttem, melyen keresztül 0,5 ml fehérjét szívtam le. Erre azért volt szükség, hogy az injektálás során a fejlődő embrió könnyebben hozzáférhetővé váljon. Ezt követően a tojás laterális oldalán a tojáshéjon egy 15x15 mm-nél nem nagyobb nyílást nyitottam, majd eltávolítottam a héjhártyát. A tojást egy steril papírvattával bélelt petri-csészébe helyeztem, mely a támasztási funkciót látta el. Körülbelül 0,5 ml, 10% penicillin – streptomycin-t tartalmazó steril, 37°C-os PBS oldatot cseppentettem a tojáson nyitott részbe a fertőzések megelőzése, valamint az embrió kiszáradásának elkerülése miatt. Így tettem a tojást a sztereomikroszkóp alá. A már korábban beállított mikromanipulátorba egy 10 μ l-es Hamilton fecskendőt rögzítettem, melynek végére egy húzott üveg kapilláris került. A mikromanipulátor segítségével az extraembrionális hárták átszúrása után a recipiens embrió szívcsövébe injektáltam 1-1,5 μ l (megközelítőleg 600-800 sejtet tartalmazó) donor sejtszuspenziót. A sikeres injektálást követően az antibiotikus PBS oldatból ismét néhány cseppet a tojásba cseppenttem, majd a manipulációhoz használt „ablakot” a tojáson dupla réteg parafilmmel lezártam. A tompa végén nyitott apró lyukat papíragasztóval zártam le. A tojásokat egyedi jelöléssel láttam el, és azonnal visszahelyeztem a keltetőgépbe.

2.8. A lehetséges kimériszmus vizsgálata mikroszatellit marker analízissel

Az embriókból, valamint a különböző embrionális szervekből származó mintákon DNS vizsgálatot végeztem. A mikroszatellit marker analízishez felhasznált agy, szív, máj és ivarszerv mintákat a kikelt állatokból, valamint a későbbi stádiumban elhalt embriókból gyűjtöttem. Csak azokat az elhalt embriókat vizsgáltam, amelyek elérték vagy meghaladták az embrionális fejlődés 10. napját.

A DNS-t minden szövetből a már korábban leírt módon (*Miller et al. 1988*) izoláltam, baromfi szövetekre optimalizált protokoll szerint. A szöveteket 300 μ l sejtmag lízis pufferben, 10 μ l proteináz K enzim, valamint 10% SDS hozzáadásával inkubáltam. A továbbiakban a vérminták esetében használt DNS izolálási protokollt használtam. Mindösszesen 191 mintát vizsgáltam és genotipizáltam melyekből 171 származott elhalt embriókból, a többi pedig a kikelt és leölt napos libákból vett minta volt. Azokat az egyedeket tekintettem kimérának, amelyek a PCR reakciót követő poliakrilamid gélelektroforézis alapján tartalmazták a donor csoportból származó (155bp), valamint a recipiens állatoktól származó (159 bp) allélokot egyaránt.

2.9. Kontroll kísérletek

Az injektálási módszer embriófejlődésre gyakorolt káros hatásainak vizsgálata céljából két kontroll kísérletet végeztem el, kísérletenként 100 termékeny lúdtojáson. Ezeket K1 és K2 kontroll csoportnak neveztem el.

A **K1** kontroll csoport volt az úgynevezett „ablakos” kontroll csoport. Ebben a csoportban a tojások laterális oldalát és légkamra felőli végét Betadine oldattal fertőtlenítettem, majd a légkamra felőli végen egy apró lyukat ütöttem, melyen keresztül steril injekciós fecskendővel 0,5 ml fehérjét szívtam le. Ezt követően a korábban fertőtlenített oldalon egy körülbelül 15 x 15 mm-es területen eltávolítottam a tojás héját és a héjhártyát. Ez után az „ablakot” parafilmmel visszazártam oly módon, hogy óvatos hevítéssel rátapadjon a megfelelő méretű darab a tojáshéjra és az „ablakot” lezárja. Keltetőgépbe helyeztem a tojásokat, majd a kelés várható időpontja előtt 2 nappal a parafilmet egy steril tű segítségével perforáltam. Minden tojás egyedi számozást kapott, továbbá feljegyzésre került a manipuláció pontos ideje, az inkubáció kezdete óta eltelt idő, továbbá, hogy az adott tojás melyik kísérleti csoportba tartozik. Ennek a kontroll csoportnak a célja az volt, hogy megvizsgáljuk az „ablak” nyitásának hatását az embriófejlődésre, egyéb manipuláció nélkül.

A **K2** kontroll csoport volt az injektált kontroll, melynél a fentebb leírtak szerint elvégeztem a tojások fertőtlenítését, valamint a fehérje leszívását és az „ablak” nyitását. Mindezekon felül a K2 kontrollcsoport tojásaiban található embriók szívcsövébe 1-1,5 μ l 5% Fast Green festékkel jelölt steril DMEM oldatot injektáltam. Az injektálást Narishige mikromanipulátorral, sztereomikroszkóp alatt végeztem el. Az intrakardiális injektálást követően az „ablakot” parafilmmel a már korábban leírt módon lezártam, és a kezelt tojásokat visszahelyeztem a keltetőgépbe. A K2 kontrollcsoportot az injektálás embriófejlődésre, túlélésre gyakorolt hatásainak vizsgálata céljából hoztam létre.

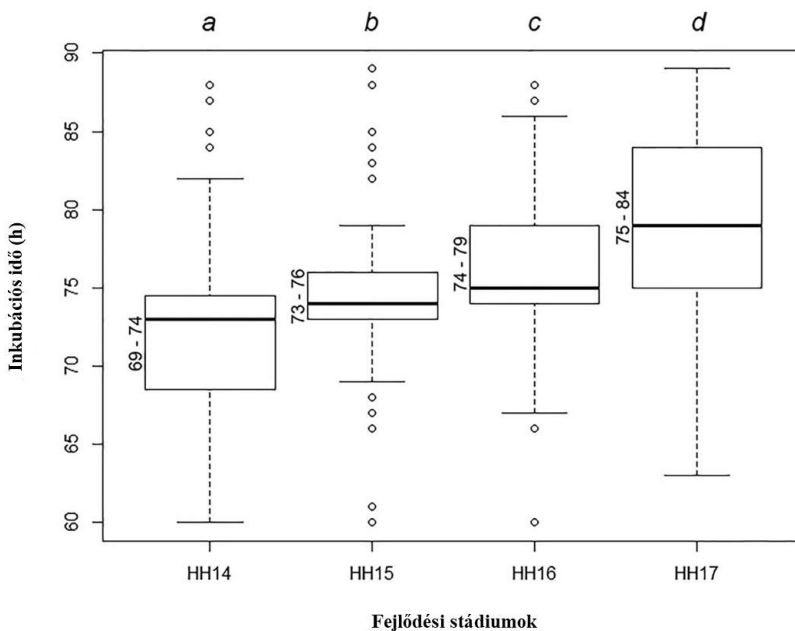
2.10. Statisztikai analízis

Statisztikai módszerekkel elemeztem a lúd embriók fejlődési szakaszainak megoszlását az inkubációs idő hosszának függvényében. Az egyes embrionális fejlődési szakaszok időbeni bekövetkezésének jellemzésére interquartilis tartományt (IQR) használtam. Az IQR érték azt az intervallumot jelöli, ahol az összes érték középső 50%-a helyezkedik el. A kísérleti csoportok összehasonlításához logisztikai regressziós modellt használtam, ahol mindkét kontroll csoport (K1, K2), valamint a kísérleti, blasztodermális sejtszuspenzióval injektált csoport (T) adatait páronkénti összehasonlításoknak vettem alá. Ezen módszer esetében az összehasonlításokat Tukey teszt (*Reiczigel et al. 2007*) segítségével végeztem. Az injektálás optimális idejének meghatározásához egy utas varianciaanalízist (ANOVA) használtam. Minden olyan esetben, ahol szignifikáns különbség volt, a három csoport eredményeinek összehasonlítására Fisher legkisebb szignifikáns differencia (LSD) tesztjét alkalmaztam. Minden kapott adatomat az R studio 0.99.489 verziószámú, valamint a Statistica 7.0 programok segítségével értékeltem, $P < 0.05$ szignifikanciaszint mellett.

3. EREDMÉNYEK ÉS AZOK MEGBESZÉLÉSE

3.1. Az embriók fejlődésének vizsgálata és az injektálás optimális időszakának meghatározása magyar lúdban

Első lépésként összehasonlító embriófejlődési vizsgálatokat végeztem, annak megállapítására, hogy a lúdembriók fejlődése hány óra keltetési idő után éri el a HH14-16 stádiumot, amikor az ősvarsejtek az embrió véráramában a legnagyobb koncentrációban vannak jelen. Statisztikai paramétereket (minimum, maximum, medián, alsó és felső kvartilis) határoztam meg (1. ábra) az inkubációs idő adatokból az egyes fejlődési szakaszok megfelelő jellemzésére. Az IQR értéket (Interkvartilis terjedelem) választottam annak leírására, hogy az egyes Hamburger és Hamilton féle fejlődési stádiumok a keltetés során jellemzően mikor figyelhetők meg a lúd fájban. A kapott eredmények az 1. ábrán láthatóak.

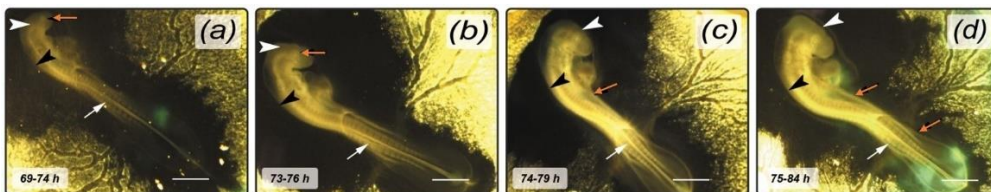


1. ábra: A vizsgált lúdembriók időbeli eloszlása a különböző fejlődési szakaszokban (A 2. ábrán látható Hamburger-Hamilton-féle fejlődési stádiumoknak megfelelő fejlettségű lúdembriók).

A négyzetdiagramok leíró statisztikai paramétereket képviselnek, a dobozok az interkvartilis terjedelmet (IQR) mutatják, melyet az egyes szakaszok tipikus fejlődési időkereteinek jellemzésére alkalmaztam, a mediánt a dobozon belül található vízszintes vonal jelzi, a dobozok alatt és felett található bajuszok mutatják a tartományt (alsó-és felső kvartilis), a kiugró adatokat pedig a körök jelzik.

- a: HH14:** Min.: 60.0, Medián: 73.0, Max.: 88.0, IQR: 68.8-74.3;
b: HH15: Min.: 60.0, Medián: 74.0, Max.: 89.0, IQR: 63.0-76.0;
c: HH16: Min.: 60.0, Medián: 75.0, Max.: 88.0, IQR: 74.0-79.0;
d: HH17: Min.: 63.0, Medián: 78.5, Max.: 89.0, IQR: 75.0-84.0)

Tehát vizsgálataim alapján a lúd embriók fejlődése **69-84** óra inkubálás után éri el (*1. és 2. ábra*) az embrionális sejtek bejuttatására optimális időszakot. A keltetésnek ebben a korai szakaszában azonban jelentős volt az egyedi eltérés az embrionális fejlődés sebességében (*2. ábra*).



2. ábra: A magyar lúd embriók injektálására optimális fejlődési stádiumok HH14 és HH17 között (Hamburger és Hamilton szerint, 1951) valamint az adott stádiumra jellemző fontosabb morfológiai tulajdonságok szemléltetése (méretarány: 1 mm).

a: HH14 stádium (69-74 óra), az embrió 22 szomitával rendelkezik (fehér nyíl), a koponya hajlásszöge kb. 90° (fehér nyílhegy), a nyaki görbület széles (fekete nyílhegy), az elsődleges optikai vezikulum kezd betűrődni (narancssárga nyíl);

b: HH15 stádium (73-76 óra), 26 szomita (fehér nyíl), a koponya hegyes szöget zár be a törzssel (fehér nyílhegy), a nyaki görbület széles (fekete nyílhegy), a szemserleg teljesen kialakult, az írisz régiójában különálló kettős kontúr látható. (narancssárga nyíl);

c: HH16 stádium (74-79 óra), ekkor az embriónak 28 szomitája van (fehér nyíl), minden görbület hangsúlyosabb (fehér és fekete nyílhegy), itt a szárnybimbó először megvastagodott gerincként jelenik meg (narancssárga nyíl);

d: HH17 stádium (75-84 óra), 32 szomita figyelhető meg (fehér nyíl), a nyaki görbület élesebben hajlított, de szöge még mindig nagyobb, mint 90° (fekete nyílhegy), először jelenik meg az epifízis (fehér nyílhegy), látható a szárny képződése és láb bimbó (narancssárga nyilak), a koponya görbülete változatlan.

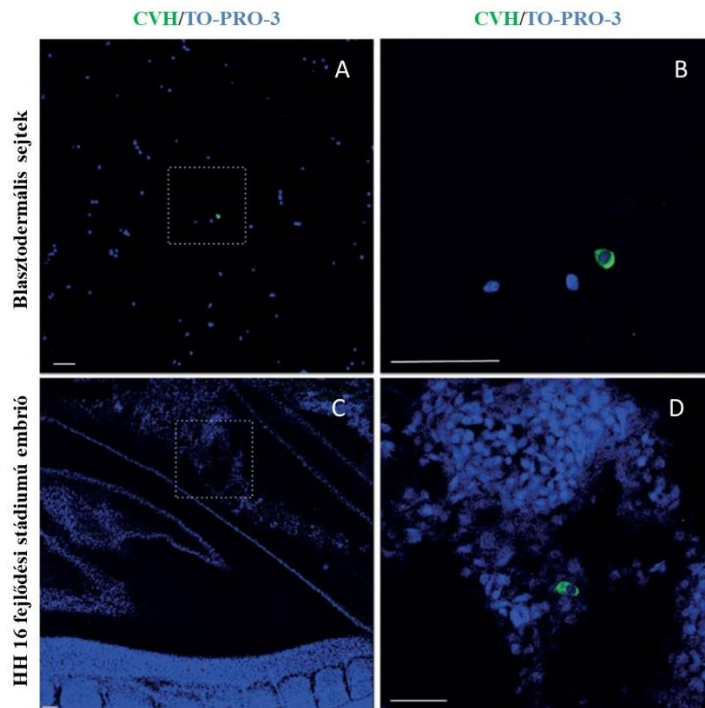
Annak megerősítésére, hogy van-e összefüggés az embrionális fejlődési stádiumok és az eltelt inkubációs idő között, statisztikai próbákat végeztem (*1. ábra*), melyek eredménye az, hogy mérsékelt pozitív korreláció van az értékek között. Ennek oka feltehetően az, hogy nagy a heterogenitás az embriók fejlődése között, valamint a teljes állomány tekintetében is (*1. ábra*). Ez az őshonos fajtákra általánosan jellemző.

Az eredmények tükrében megállapítható, hogy az ekvivalens HH14-17 fejlődési stádium, mely szakaszban a PG sejtek vándorlása feltehetően bekövetkezik, lúd embriókban 69 és 84 órás inkubációs idők között fordul elő legnagyobb gyakorisággal.

Arra a megállapításra jutottam, hogy ez az időablak alkalmas lehet a blasztodermális sejtek véráramba injektálásával csírvonalas kiméra utódok létrehozására.

3.2. A lúd ősvarsejtek vándorlásának vizsgálata az embrióban immunfestéssel

A kísérlet tervezésekor sarkalatos pont volt az a hipotézis, hogy egyrészt a korai blasztodermális sejtek között található ősvarsejtek is, másrészt az, hogy a lúdembrióban is ugyanazokban a fejlődési stádiumokban történik az ősvarsejtek vándorlása az ivarszervek felé, mint a házityúknál. A 3. ábrán látható ősvarsejt-specifikus immunfestés bizonyította, hogy az általam kinyert lúd blasztodermális sejtuszpenzió tartalmaz ősvarsejteket, és a lúdembrióban ugyanazokban a fejlődési stádiumokban történik az ősvarsejtek vándorlása, mint a házityúknál. Ilyen irányú vizsgálatokat eddig nem végeztek lúd fajban.



3. ábra: Immunfestett primordiális őscsírasejtek (PGC) a blasztodermális sejtek között (A, B) és egy HH16-os stádiumú lúdembrió véráramában vándorlás közben (C, D).

A fotókon csirke vasa homológ (CVH) pozitív PGC sejtek láthatók a blasztodermális sejtuszpenzióban (A, B) és egy HH16-os stádiumú lúd embrió extraembrionális régiójában (C, D). A B és D jelzésű fotók az A és C fotókon négyzettel bekeretezett terület nagyobb nagyítású képei. A sejtmagokat TO-PROTM-3-mal festettem. Méretarányok: 50 μ m

3.3. Az intrakardiális injektálás 3 napos lúd embrióba és az így elérhető kiméra előállítás hatékonysága

Munkám célja volt annak megállapítása, hogy az inkubátlan, frissen tojt lúdtojásból gyűjtött blasztodermális, illetve korai PG sejtek megfelelő HH fejlettségű recipiens embrió véráramába injektálva eljutnak-e az embrió ivarszervébe és kolonizálják-e azt. Azaz, kimutathatók-e a donor genotípusú sejtek a recipiens embriókban, illetve kikelt állatokban. Az injektálási kísérletek során 249 egészséges, megfelelő fejlődési stádiumban lévő lúd embrió szívcsövébe injektáltam mikromanipulátor segítségével a recipiens blasztodermális sejtuszuspenzióból 1-1,5 µl mennyiséget (600–800 sejt).

Az injektálást akkor ítélték sikeresnek, ha az embrió elérte, illetve meghaladta fejlődésének 10. napját (*1. táblázat*). Az eddig az időpontig bekövetkező embrionális halálózást tekintettem a módszer közvetlen hatásának. Ezen kritériumok figyelembevételével a kezelt csoportban 83 embriót vizsgáltam mikroszatellit markerekkel, a kikelt kislibák száma 19 volt (*1. táblázat*).

A mikroszatellit marker analízist összesen 171 mintán végeztem el, mivel a vizsgálatban részt vevő 83 embriónak külön-külön több szervét is vizsgáltam. Három embrióban találtam (egy 12 napos korban elhalt (D12), valamint 2 kikelt egyed, 3,6 %) a donor sejt vonal beépülésére utaló allélt az ivarszervekben. Továbbá találtam egy olyan, 13 napos inkubálást követően elhalt embriót, melynek agy- és szívizomszövet mintáiban is kimutattam a donor allélt. Így a kapott kiméra egyedek aránya **4,8%** volt (a 10 napos inkubációs időt meghaladóan is továbbfejlődött embriók számának tükrében). Donor sejteket is tartalmazó egyedeket találtam a 10 naposnál rövidebb inkubációs idő alatt elhalt embriók között is, de ezeket nem számítottam sikeresnek a kísérlet szempontjából.

Az injektálásokat 72 - 78 órás inkubálást követően hajtottam végre. Érdekes megjegyezni, hogy az egyik kiméra a 73 órás (73 óra 44 perc) injektált csoportból, egy másik a 75 óra keltetés után injektált csoportból, kettő pedig a 76 órás inkubációt követően injektált csoportból került ki.

A kezelés optimális idejének meghatározása során mindkét kontrol csoportban a **75. órában** végzett beavatkozás bizonyult szignifikánsan jobbnak a kísérlet szempontjából jónak minősített embriók arányát illetően. Ez az összefüggés a kísérleti csoportban nem volt szignifikáns.

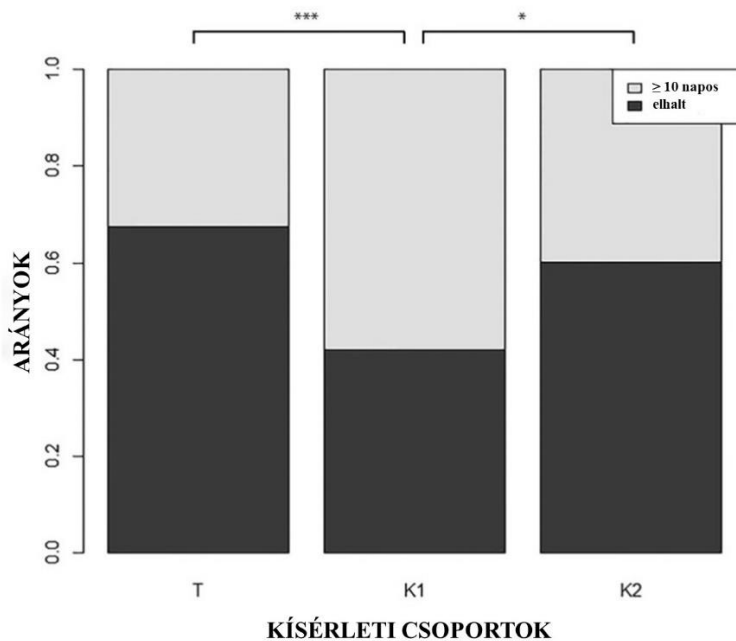
INKUBÁCIÓS IDŐ (h)	K1			K2			KÍSÉRLETI CSOPORT (T)			
	tojások száma	≥10 napos embriók száma	kikeltek száma	tojások száma	≥10 napos embriók száma	kikeltek száma	tojások száma	embriók száma	kikeltek száma	≥10 napos kimérák száma
72	0	0	0	7	0	0	4	3	0	0
73	9	3	2	38	10	3	35	9	2	1
74	27	17	9	26	13	6	78	27	7	0
75	41	29	22	14	10	6	64	21	6	1
76	17	6	5	9	5	3	43	13	2	2
77	6	2	1	6	2	2	23	8	2	0
78	0	0	0	0	0	0	2	2	0	0
Összesen (db) (%)	100	57 (57%)	39 (39%)	100	40 (40%)	20 (20%)	249	83 (33,33%)	19 (7,63%)	4 (1,6%)
% -os adatok a kísérleti csoportban a 10. inkubációs napot meghaladóan élő („jónak” tekintett) embriók számának függvényében								100%	22,9%	4,8%

1. táblázat: A kísérleti adatok összefoglalása:

K1: Az „ablakos” kontrollcsoport, amelyben a tojáshéj és a héjmembrán eltávolításával 15x15 mm-es „ablakot” nyitottam a tojáson, majd az ablakokat dupla Parafilm réteggel lezártam, amelyet a kikelés előtt 2 nappal perforáltam; **K2:** Injektált kontrollcsoport, amelyben a recipiens embriók szívcsövébe az ablak létrehozása után 1–1,5 µl DMEM tápoldatot injektáltam. A kísérleti csoportba (T) tartozó embriókat blasztodermális sejtszuspenzióval injektáltam.

3.4. Az injektálás hatása a recipiens embriók mortalitására

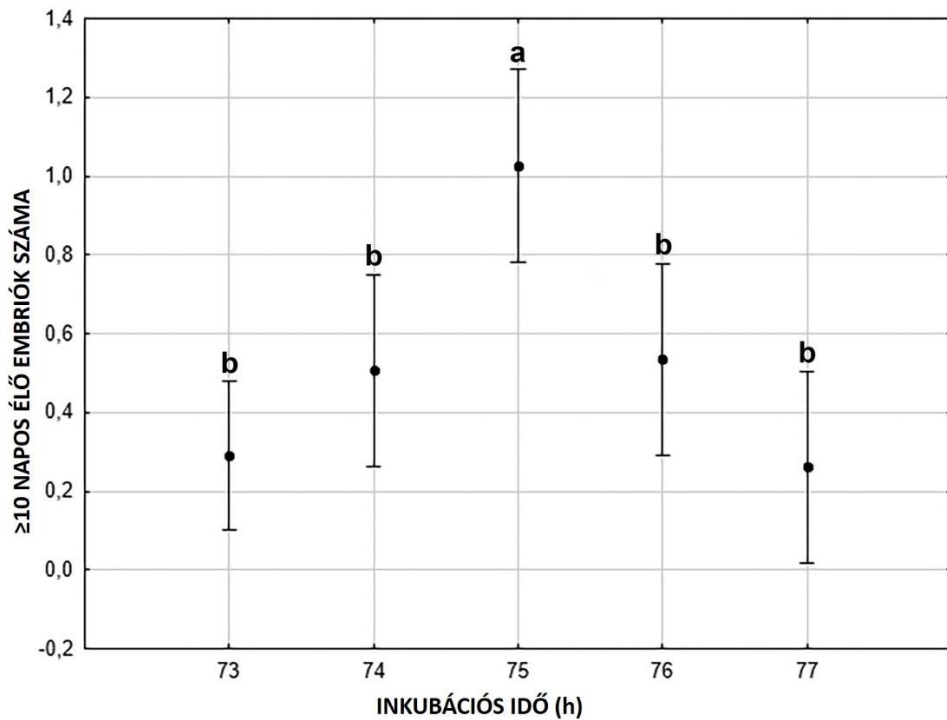
Összehasonlítva a **K1** (57/100 és 39/100), illetve a **K2** (40/100 és 20/100) kontrollcsoportokban az embrionális fejlettségi és a kelési arányokat az injektált (T) csoport eredményeivel (83/249 és 19/249), megállapítható, hogy a 10 napos inkubációs időt meghaladóan életben maradt és a kikelt kislibák száma az eljárás invazivitásának növekedésével csökkent (1. táblázat). Az elvégzett Tukey-teszt szignifikáns különbségeket mutatott a T és a K1 csoportok között ($P < 0.001$), valamint a K1 és a K2 kontroll csoportok között is ($P = 0.0288$), ellenben nem volt szignifikáns különbség sem a 10 napnál idősebb korban elhalt embriók számában, sem a kikelt kislibák arányában a T és a K2 csoport között. Ezen megfigyeléseim arra engednek következtetni, hogy a blasztodermális sejtek injektálása a csak festék injektálásához viszonyítva, nem növelte érdemben az embriók mortalitását (4. ábra).



4. ábra: Az embrionális elhalás mértéke a különböző kísérleti csoportokban

A **T** (Treated) a kezelt csoport, amelyben a 15x15 mm-es, tojáshéjon és héjhártyán nyitott ablakon keresztül donor blasztodermális sejtszuszpenziót injektáltam a recipiens embriókba, majd dupla réteg parafilmmel zártam az ablakot. A **K1**, vagyis az „ablakos” kontroll csoport esetében csak a 15x15 mm-es „ablakot” nyitottam, ezt követően dupla réteg parafilmmel visszazártam, de nem injektáltam a tojásba. A **K2**, injektált kontroll csoport, mely csoport egyedeinek szívcsövébe az „ablak” nyitása után 1-1,5 µl DMEM tápoldatot injektáltam, ezt követően dupla parafilm réteggel zártam a nyílást. A kezelt (T) és a két kontroll csoport (K1, K2) mortalitási adatait logisztikus regresszióval, Tukey teszt segítségével hasonlítottam össze. Szignifikáns eltérés tapasztalható a kezelt (T) és a K1 kontroll csoport értékei között (***) $P < 0.001$), és a két kontroll csoport adatai között (* $P = 0.0288$)

A statisztikai számítások alapján manipuláció optimális ideje **75 óra** inkubálás környékén van. Ebben az időszámban kaptam a két kontroll csoportban a legtöbb „jó” besorolású embriót (10 nap inkubálást túlélő embriók, 5. ábra), ez az összefüggés azonban nem volt szignifikáns a kísérleti (T, blasztodermális sejtszuszpenzióval injektált) csoport esetében. Mivel a kikelt kimerákat a 74–76 órás inkubálást követően injektált embriókból nyertem, ebben az időintervallumban várható a legnagyobb eséllyel a sikeres intracardialis injektálás.



5. ábra: Az élő embriók (≥ 10 nap) száma a különböző injektálaskori időcsoportokban (a; b: P <0,001):

A nyers adatok Arcsin-transzformációját követően egy utas Anova és Fisher LSD módszereket alkalmaztam a lehetséges különbségek feltárására. Az elemzés szerint a 75 órás csoportban szignifikánsan több élő embrió volt, amely elérte a 10. embrionális fejlődési napot (az injektálást követően), mint bármely más csoportban. (Az X tengelyen lévő számok jelzik az inkubáció hosszát.)

4. KÖVETKEZTETÉSEK ÉS JAVASLATOK

4.1. Embriófejlődési vizsgálatok házilúd fajban

A házilúd őssejtekkel folytatott kutatások esetében az ovipozíciótól kezdődően történő, a házityúk HH embriófejlődési stádiumokhoz hasonlított embriófejlődési vizsgálatok kiemelten fontosak. Ezek a vizsgálatok nem csak faj, hanem akár fajta szinten is jelentősek, mivel egyrészt a házilúd kelési ideje jelentősen eltér a házityúkéétól, másrészt a tapasztalatok alapján – főként őshonos fajták esetében – akár egyedek szintjén is igen nagy variabilitást mutat. Tyúk fajban az ősvarsejtek jelenléte a keringési rendszerben a HH14-es stádiumban éri el a maximumát (50-53 órával a tojásrakást követően) (Tajima et al. 1999). A vándorló ősvarsejtek az intermedier mezoderma területén lépnek ki a keringésből, és kezdenek koncentrálni a HH15 – HH17 stádiumtól kezdődően (házityúkban 52-64 órával a tojásrakást követően) (Nakamura et al. 2007). Kutatásom szempontjából különösen jelentős ennek az úgynevezett „ablak periódusnak” a meghatározása, amikor az ősvarsejtek a véráramban vándorolnak. Feltételezésem szerint ez az időszak a tyúk fajjal azonos embrionális fejlődési stádiumokban következik be, azonban az időszak a hosszabb kelési idő miatt eltolódik. A kísérleteim megkezdésekor a vonatkozó szakirodalomban ennek az időszaknak a részletes vizsgálatára vonatkozó eredményeket nem találtam házilúd esetében.

Liptói (2005) leírta a házilúd embriófejlődését ovipozíciótól a kikelésig, azonban ez a vizsgálat nem a HH embriófejlődési stádiumokhoz hasonlítva mutatja be a lúdembrió keltetés közbeni fejlődését, hanem csak napokra lebontva.

Lukaszewicz és munkatársai (2017) inkubálatlan és 4, 8, 12, 16 órás inkubálást követően vizsgálták az embriófejlődést fehér koluda lúd fajtában a házityúk HH és EG&K stádiumaihoz viszonyítva az EG&K X. stádiumtól kezdődően. Munkájuk során arra az eredményre jutottak, hogy az inkubálatlan tojásból származó lúd embriók az EG&K X. és XI. stádiumban voltak. Megfigyeléseik alapján az egyedek már ekkor nagy szórást mutattak a fejlettség tekintetében. A 16 órás inkubáció elteltével az embriók fejlettsége HH2 - HH4 fejlettségi stádium közé esett. Eredményeik azt mutatják, hogy míg az inkubálatlan lúdtojásban az embrió fejlődési stádiuma hasonló a tyúkéhoz, a lúdembrió átmérője valamivel nagyobb. Az inkubációt követően a lúdembrió lassabban fejlődik, mint a csirkeembrió, az általuk vizsgált 16 órás inkubációs idő végéig. Ez a kutatás jóval részletesebben elemzi a házilúd korai embriófejlődését, azonban azt a periódust, amelyben az ősvarsejtek vándorlási csúcsa megfigyelhető a véráramban (HH14-17-nek megfelelő állapot) már nem vizsgálták. Azt azonban ez a kutatócsoport is megállapította, hogy fejlettség tekintetében nagy az eltérés fajtán belül a lúdembriók között már igen korai fejlődési stádiumban is.

Sellier és munkatársai (2006) számos madárfaj embriófejlődésének összehasonlítását végezték el az ovipozíciótól az inkubáció 72. órájáig, az EG&K valamint a HH fejlődési stádiumokat alapul véve. Az embriók fejlődését 6 óránként vizsgálták, kiindulásként 145 házityúk tojást vizsgáltak meg. Arra a megállapításra jutottak, hogy míg a tyúkembrió a megtojáskor EG&K X. stádiumban van, addig az általuk vizsgált landesi lúd EG&K XI. stádiumban. Hosszabb (28-30 napos) kelési ideje miatt a tyúkhöz viszonyítva az adott HH stádiumokat hosszabb inkubációs idő alatt éri el. Az én vizsgálataim szempontjából kiemelten fontos HH14-17 fejlődési szakasz megfigyeléseik szerint a csirkeembriók átlagosan 48 és 60 órás inkubációs idő között, míg az általuk vizsgált 251 lúdembrió a HH14-16 fejlettséget 60 és 72 órás keltetési idő között éri el. Az általuk kapott adatok nagyságrendileg megfelelnek az általam kapottakkal, mely szerint az őshonos magyar lúd embriók többsége a HH14-17 stádiumnak megfeleltethető fejlettséget 68,8-84 órás inkubációs idő eltelte után éri el. Fontos különbség azonban a két vizsgálat között, hogy míg *Sellier* kutatócsoportja hat óránként vizsgálta a fejlettséget, én az inkubáció 60. órájától kezdve a 89. óráig 10 percenként monitoroztam az embriók fejlettségét, összesen 745 embriót megvizsgálva. További jelentős eltérés a két vizsgálat között, hogy őshonos fajok esetében az embriófejlődés üteme jelentős egyedi eltéréseket mutat, így méginkább indokolt volt ezt a vizsgálatot elvégezniem.

Li és kollégái (2019) a teljes embriófejlődést vizsgálták és hasonlították a tyúk HH embriófejlődési stádiumaihoz kacsza és lúd esetében, azonban nem az általam vizsgált *Anser anser domestica* (házilúd), hanem az *Anser cygnoides* (kínai hattyúlúd) faj embrióit vizsgálták. 600 lúdtojást vizsgáltak meg összesen, a keltetés első 72 órájában óránként vizsgálták az embriók fejlettségét, majd a harmadik naptól a tizedikig hat óránként. A kutatásom szempontjából fontos stádiumok tekintetében arra jutottak, hogy a HH13-as stádiumot 55-62, a 14-est 61-65, a 15-öst 63-69, a 16-ost 67-73, a HH17-es stádiumnak megfelelő fejlettséget pedig 71 és 86 órás inkubálási idő között érték el a hattyúlúd embriók, amely eredmények hasonlóak az általam kapottakhoz. Bár más lúdfajról van szó, a *Li* kutatócsoportja által elvégzett, az eddigiéknél alaposabb és átfogóbb embriófejlődési vizsgálatok jó összehasonlítási alapnak bizonyulnak az én vizsgálataimhoz.

4.2. Új módszer kidolgozása a házilúd embrionális sejtek segítségével történő génmegőrzésére ivarszervi kiméra előállításával

A Természetvédelmi Világszövetség Vörös listáján összesen 11.147 madárfaj szerepel, melyek 13,3%-a, azaz 1486 faj súlyosan veszélyeztetett, veszélyeztetett, vagy sebezhető kategóriákba sorolt (*IUCN Red List*). Az ENSZ Élelmezésügyi és Mezőgazdasági Szervezete (FAO) háziállatokkal kapcsolatos felméréseinek adatai alapján a 40 fajhoz tartozó közel 8800 bejegyzett fajta 7%-a már kihalt és további 24%-a kihalással fenyegetett (FAO 2019, <http://www.fao.org/resources/infographics/infographics-details/en/c/174199/>). A világon 3689 baromfi fajtát tartanak nyilván, melyek közül 2222 őshonos. Ezen fajták 28%-a veszélyeztetett, sebezhető vagy már kihalt (FAO, DAD-IS). Ezekből az adatokból látható, hogy a domesztikált baromfifajták és a vadmadár fajok jelentős része valamilyen kockázati kategóriába sorolható. Emiatt mielőbbi aktív cselekvésre és megfelelő védelmi stratégiákra van szükség, hogy a jelenleg tapasztalható folyamat lassíthatóvá, később megállíthatóvá váljon. Az őshonos baromfifajták értékes és ritka genetikai információjának megőrzése kiemelkedően fontos a mezőgazdasági biodiverzitás fenntartása szempontjából (Wang et al. 2017).

Hazánkban a lúdtenyésztés tradicionális, és gazdaságilag jelentős ágazata az állattenyésztésnek, ezért is fontos, hogy az őshonos magyar lúd genetikai állományát megőrizzük. Kutatómunkám során olyan módszert dolgoztam ki, amely lehetővé teszi a faj mindkét ivarának genetikai anyagának (W kromoszóma és a mitokondriális DNS) hosszútávú megőrzését. Tanulmányaim és kutatási munkám kezdetén (2012-ben) nagyon kevés kutatás foglalkozott madár ősvarsejtekkel, csak részleges eredmények születtek, azok is csak házityúk fajban. Intézetünkben régóta foglalkoztak blasztodermális sejtekkel történő génmegőrzési kutatásokkal számos madárfaj esetében, így ennek a módszernek a továbbfejlesztését tűztem ki célul a lúd fajra vonatkoztatva. Vizsgálataim során arra törekedtem, hogy ötvözzem a blasztodermális sejtek kinyerésének egyszerűségét az ősvarsejtek ivarszervekbe történő vándorlási képességének kihasználásával. Így egy új módszert fejlesztettem összejtek hatékony bejuttatására házilúd fajban.

Mivel a házilúd embrionális sejteinek felhasználásával a génmegőrzési kutatásokban nagyon kevés szakirodalom foglalkozik (mind blasztodermális sejtek, mind PG sejtek vonatkozásában), így a vizsgálataim során kapott eredményeket más madárfajok embrióin végzett, hasonló témájú vizsgálatokkal vetem össze.

Donor blasztodermális sejtek recipiens EG&K X. stádiumú recipiensekbe történő injektálásával végzett kiméra-előállítási kísérleteket számos kutatócsoport végzett korábban több faj esetében is. Lúd fajban egyedül *Bednarczyk és munkatársai (Bednarczyk et al. 2003)* számoltak be donor

blasztodermális sejtek injektálásáról recipiens EG&K X-XII stádiumú embriók szubgerminális üregébe, ahol a kezelt tojások 6,7%-a kelt ki, de a kikelték közül egyetlen állat sem bizonyult ivarszervi kimérának. Tyúk fajban *Carsience és kutatócsoportja (1993)* végeztek egy olyan vizsgálatot, ahol kezeletlen White Leghorn, és különböző dózisu γ sugárással kezelt EG&K X. stádiumú recipiensbe injektáltak megközelítőleg 100, illetve 200-400 Barred Plymouth Rock termékeny donor tojásból származó blasztodermális sejtet. A szomatikus kimérizmust tollszín alapján, míg az ivarszervi kimérizmust a kikelt egyedek Barred Plymouth Rock-al történő visszakeresztezésével állapították meg. A csíravonalas kimérizmus gyakorisága körülbelül 100 donor sejt injektálását követően besugárzott recipiens alkalmazásával szignifikánsan ($P < 0,001$) magasabb volt (3/24 db, 12,5%), mint a kezelést nem kapott recipiensek esetében (2/106 db, 1,9%). Az injektált sejtek számának növelése nem volt hatással a kimérizmus gyakoriságára a nem besugárzott recipiensek esetében. Besugárzott recipiensekbe 200-400 sejtet injektálva az ivari kimérizmus gyakorisága szignifikánsan ($P < 0,01$) 8/14-re (57,1%) emelkedett. Itt a kikelt egyedek számához viszonyították az ivarszervi kimérák arányát. Összességében megállapították, hogy a besugárzás hatására az embriók némiképp elmaradtak a fejlődésben, elhúzódóbb kelést produkáltak, valamint az összes tojásból jelentősen alacsonyabb százalékban keltek ki, de a kikelték számát alapul véve nagyobb arányban voltak köztük ivarszervi kimérák, mint a kezeletlen recipiensek esetében. A nem besugárzott, összes kikelt egyedhez viszonyítottan kapott csíravonalas kiméra arány (1,9%) hasonlítható leginkább az általam kapott ivarszervi kiméra arányhoz, ahol a kikelt egyedek (19 állat) számához viszonyítva a kikelt egyedekből ivarszervi kiméra **10,52%** (2 egyed) lett. Tehát az általam kidolgozott fejlesztés, mely szerint a blasztodermális sejtszuspenziót nem egy másik embrió blasztodermájának szubgerminális üregébe, hanem a 3 napos embrió szívcsövébe/véráramába injektálom, jelentősen megnövelte a kapott ivarszervi kimérák arányát. *Kino és munkatársai (1997)* friss, valamint fagyasztott-felolvasztott blasztodermális sejtekkel dolgoztak. Megközelítőleg 500 db Barred Plymouth Rock fajtából származó blasztodermális sejtet injektáltak besugárzott EG&K X. stádiumú White Leghorn recipiens embriók szubgerminális üregébe. Az injektálást friss, valamint Percoll és Nycoprep grádiensen centrifugált fagyasztott-felolvasztott blasztodermális sejtekkel is elvégezték. A keltetést injektálás után az eredeti recipiens tojásnál 20-25 g-al nagyobb helyettesítő tojáshéjban végezték. A szomatikus kimérizmust szín alapján, az ivarszervi kimérizmust tesztkeresztetésekkel állapították meg. Friss blasztodermális sejtszuspenzióval 59 recipiens injektálását végezték el, melyekből 24 állat kelt ki, ebből 22 volt szomatikus kimérának valószínűsíthető. A tesztkeresztetést 16 egyed esetében végezték el, ez alapján 9 bizonyult ivarszervi kimérának (az összes tesztkeresztetésbe vett egyed 56%-a).

Fagyasztott-felolvasztott sejtek esetében alacsonyabb hatékonyságot értek el, de az összehasonlítás az én kísérletemmel ez esetben nem releváns, mivel én frissen kinyert blasztodermális sejtekkel dolgoztam. A kapott eredmények összevethetőségét nehezíti, hogy *Kino kutatócsoportja* besugárzott recipienseket alkalmazott, így a donor sejtek beépülésének esélye megnő, valamint a keltetés során másikkal, nagyobb tojásbélyegbe helyezték a fejlődő embriókat. Ezen felül a tyúk, mint kísérleti állat a lúddal szemben a manipulációkat jobban viseli, a keltetési körülményekre és különféle behatásokra jóval kevésbé érzékeny. *Li és munkatársai (2002)* interspecifikus kiméra létrehozására tettek kísérletet donor Maya kacska és White Leghorn tyúk recipiens fajták felhasználásával. EG&K X. stádiumú recipiens tyúk embrió szubgerminális üregébe injektálták a donor eredetű kacska blasztodermális sejteket. A kísérletet elvégezték egy 600 rad γ besugárzást kapott, 112 recipiens injektált egyedből álló (1-es) csoporton, valamint egy 121 recipiens egyedből álló, kezeletlen (nem besugárzott) kontroll csoporton (2-es). A kezelt csoportban 112 állatból 14 kelt ki (12,5%), a 13 napot meghaladóan fejlődött embriók és kikelt állatok közül tollszín alapján a testi kimérizmus 18 egyed esetében volt valószínűsíthető (16%), melyek közül azonban csak 4 állat (3,57%) kelt ki. A nem besugárzott kontroll csoport 121 egyedéből 21 állat kelt ki (17,4%), 12 egyed (9,9%) esetében valószínűsítették a szomatikus kimérizmust tollszín alapján, melyek közül kikelt állat 7 egyed volt (5,78%), a többi kelés előtt elpusztult. A donorral történő visszakeresztezést követően arra a következtetésre jutottak, hogy mindössze egy hímvivő állat (**0,82%**) bizonyult ivarszervi kimérának, mely a kezeletlen csoportból került ki. Ez a kísérlet egyrészt rávilágít, hogy egy veszélyeztetett faj esetében fajok közötti kimérák létrehozásával is megvalósítható az eredeti faj visszanyerése, másrészt érdekes eredménnyel szolgál a besugárzással kezelt recipiensek kérdésében. A keltethetőséget és a fejlődési erélyt a besugárzás egyértelműen rontja, mint azt korábbi vizsgálatokban is leírták, azonban itt az általuk kapott egyetlen ivarszervi kiméra egyed érdekes módon nem a besugárzott recipiensek csoportjából származott, habár korábbi kutatásokban javarészt olyan eredményeket kaptak, miszerint a recipiensek besugárzása növeli a kimérák (szomatikus és ivarszervi egyaránt) létrejöttének valószínűségét.

Jelenleg az ősvarsejtek hatékony, hosszútávú, ivarsejt létrehozó képességüket megőrizni képes sejtenyészetek fenntartása csak a házityúk fajtában megoldott (*Van De Lavoie et al. 2006; Macdonald et al. 2010; Whyte et al. 2015; Oishi et al. 2016; Tonus et al. 2016; Kong et al. 2018*). Az egyéb madárfajokat illetően nagyon kevés a sikeres próbálkozás az ősvarsejtek tenyésztését és fenntartását illetően.

Lúd ősvarsejtek tenyésztésével és fenntartásával (*Doddamani, 2019*) egyetlen korábbi kutatás foglalkozik, azonban a módszer még fejlesztés alatt áll. Az ősvarsejteket az általuk fejlesztett szérumentes, BMP4 tartalmú

médiumban három hónapot meghaladó ideig voltak képesek fenntartani, azonban a proliferációs ráta elmaradt a házityúk sejtenyészetek esetében tapasztaltaktól. Ebben a vizsgálatban nem végezték el a donor eredetű PG sejtek *in vivo* tesztelését, azaz a tenyészeteket csak proliferációs tesztekkel, génexpressziós vizsgálatokkal minősítették, nem végezték el a sejtek recipiensbe történő visszainjektálását.

Zebra-pinty (*Taeniopygia guttata*) ősvarsejt vonalakat Jung és munkatársai (Jung et al. 2019) 30 napot meghaladó ideig voltak képesek tenyészetben fenntartani, táplálósejt réteg és magas FBS koncentráció (10 %) alkalmazásával. Gessara és munkatársainak célja egy táplálósejt mentes, minimális FBS tartalmú tenyésztő médium létrehozása volt a zebra-pinty ősvarsejt számára, a korai differenciálódás elkerülése miatt (Gessara et al. 2020). Az általuk alkalmazott körülmények között a sejtenyészetben 15-20 nap elteltével pusztulásnak indultak a sejtek. Az általuk *in vitro* tenyésztett, GFP-jelölt sejtekből körülbelül 500 darabot injektáltak a frissen tojt, termékeny recipiens tojások blasztodiszskéji alá. 22 injektált tojásból 10 egyed (45,4%) kelt ki vegyes ivarban (6 tojó és 4 hím), melyek mindegyikének gonádjában megtalálhatóak voltak a donor eredetű, tenyésztett, GFP-jelölt ősvarsejtek.

Yakhkeshi és kutatócsoportja (2018) japán fürj (*Coturnix japonica*) ősvarsejteket izoláltak HH13-15-nek megfelelő stádiumú embrió véreből, valamint HH28-30-nak megfelelő stádiumú embrió gonádjából. Ezeket a sejteket fürj embrionális fibroblaszt táplálórétegen tenyésztették. 40-50 nap elteltével a vérből izolált PG sejtenyészetben a sejtek száma a 100-szorosára, míg a gonád-eredetű PG sejtek száma a 400-szorosára nőtt, így kísérleteikhez az utóbbiakat használták a továbbiakban. A sejtek proliferációs-és génexpressziós vizsgálatain túl migrációs és beépülési hatékonyságuk vizsgálatára 1000 db GFP+ ősvarsejtet injektáltak HH13-15 stádiumú recipiens embrió szívcsövébe. A 310 embrióból a 6. inkubációs napon 59%-os túlélést, míg a 16. napon 34%-os túlélést tapasztaltak. A 6. napon élő embriók 16%-ában találták meg a GFP-t tartalmazó ősvarsejteket, a 16. napon még élő embrióknak pedig a 24%-ában. Ebből arra következtettek, hogy a tenyésztett PG sejtek normális vándorlási- és beépülési képességgel rendelkeznek.

Tagami és munkatársai (2017) megállapították, hogy az EG&K X. stádiumú (frissen tojt) házityúk embrió már tartalmaz korai PG sejteket, ennek analógiájára feltételeztem, hogy ez a lúd esetében is így van. Későbbi, immunfestéses vizsgálataim ezt a felvetést igazolták.

Kísérletemben az összesen 249 db injektált recipiens embrióból 83 fejlődött a 10 napos inkubációs időt meghaladóan (33%). A továbbiakban a kísérlet szempontjából sikeres injektálásnak ezt az egyedszámot tekintettem. 83 egyedből 19 kikelt napos állatot kaptam (22,9%), valamint a 83 embrióból 4 embrióban sikerült kimutatnom a donor sejtek jelenlétét igazoló allélt (4,8%).

Amennyiben a sikerességet a kikelt egyedszámra vetítem, az élő egyedek **10,52 %-a** bizonyult ivarszervi kimérának (2 db). Pontosan ilyen típusú kísérletet eddig egyetlen faj esetében sem végeztek, azonban *Gessara és munkatársai* zebraapintyen végrehajtott, szubgerminális üregbe történő PG sejt injektálási kísérlete mintegy a „fordítottja” az én vizsgálatomnak. A kelési arány náluk igen magas volt (45,4%, 22 állatból 10), de eleve kevés volt a kezelt embriók száma az én vizsgálatomhoz képest. Érdekes eredmény továbbá, hogy az összes kikelt egyed ivarszervében ki tudták mutatni a donor PG sejtek jelenlétét. Ők a ki nem kelt állatok tekintetében nem tettek közzé adatokat, ez esetleg nagyobb betekintést engedett volna a kísérlet sikerességébe, illetve mivel semmilyen más irodalmi forrás nem számol be 100 %-os ivarszervi kiméra arányról semmilyen faj vonatkozásában, ez némiképp megkérdőjelezi ezt az eredményt. Yakhkeshi kutatócsoportjának fürjekén végzett kísérletét összevetve az általam kapott eredményekkel arra a következtetésre jutottam, hogy bár ők tenyésztett PG sejteket injektáltak a recipiens embriók véráramába, a kísérletük során tapasztalt túlélés (a 6. napon 59%, a 16. napon 34%) hasonlóan alakult az általam 10 napot meghaladó inkubációs idő esetében tapasztalt túléléssel (33%), és itt már jóval nagyobb volt az injektált recipiens embriók száma is (310 egyed). A PG sejtek beépülése tekintetében jobb eredményeket értek el nálam (10 napos inkubációt túlélő egyedek 4,8%-a ivarszervi kiméra), azonban kikelt egyedről velem ellentétben nem számoltak be.

A kísérletem során alkalmazott új módszer azért működik hatékonyabban, mint az EG&K X. stádiumban kinyert, és ugyanebben a stádiumban a recipiens tojás szubgerminális üregébe visszainjektált blasztodermális sejtek alkalmazásán alapuló módszer, mert így a sejtek nem mozaikosan épülnek be testszerte, szomatikus kimérákat létrehozva, hanem jóval hatékonyabban kolonizálják a recipiens gonádokat, és így nagyobb arányban keletkeznek ivarszervi kimérák. A lúd PG sejteknek megfelelő tenyésztőmédiüm fejlesztése, majd a sejtenyészetek hosszútávú, hatékony fenntartása az általam alkalmazott módszernél nehezebben kivitelezhető, költségigényesebb, és nagyobb munkaerő- és laborhátter igénye van. Következtetésképp az általam fejlesztett módszert - a frissen tojt tojásból kinyert, korai ősvarsejteket is tartalmazó blasztodermális sejtszuspenzió injektálását a HH14-17-nek megfelelő fejlettségű recipiens lúdembrió szívcsövébe – alkalmasnak találom az őssejtekkel történő génmegörzés kivitelezésére lúd fajban.

4.3. Javaslatok

A lúd embriófejlődési vizsgálatokat érdemes lenne kiterjeszteni több lúdfajtára az EG&K X. stádiumtól kezdve a kikelésig, lehetőség szerint minél több embrió vizsgálatával, a fejlődés maximum óránkénti ellenőrzésével. Így

létrehozható lenne egy adatbázis, mely alapján jobb képet kapnánk a fajták között fellelhető embrionális fejlődésbeni különbségekről. Hasznosnak ítélném továbbá az embriófejlődési vizsgálat komplexebbé tételét a tojások méretének, súlyának, illetve cikluson belüli megtojási idejének monitorozásával, mivel ezek az értékek összefüggenek a fejlődés sebességével. Ez a további kutatások szempontjából hasznos adat lehetne.

A módszer fejlesztését illetően javasolnám a felhasznált donor eredetű sejtek fluoreszcens jelölését, így vizsgálhatóvá válna vándorlásuk és letelepedésük a recipiens embrióban. Továbbá még egyszerűbbé tehető a módszer, ha az injektáláshoz szájpipettát alkalmazunk. A későbbiekben érdemes volna egy kísérletet elvégezni fagyasztott/felolvasztott őssejtek alkalmazásával is. Amennyiben kidolgozásra kerül a hosszútávú fenntartást lehetővé tévő lúd ősvarsejt-tenyésztő médium, a fenntartott sejtvonalak ivarsejt képző képességét mindenképpen tesztelni kell visszainjektálással is, melynek eredményei összevetésre kerülhetnének az általam kapottakkal.

A módszer felhasználását illetően javasolnám a hazai őshonos és termelő lúdfajták és vonalak embrionális sejtjeinek elhelyezését az Intézetünkben meglévő Génbankban. Ez nagy jelentőséggel bírna egyrészt, mert a lúdállományokat folyamatosan veszélyezteti a madárinfluenza fertőzés miatt történő hatósági leölés, ez minden évben bekövetkezik néhány tenyésztőnél. Másrészt a lúdentenyésztők részéről igény merült fel arra vonatkozóan, hogy az éppen nem használt vonalaik genetikai anyagának fenntartása ne élő formában, hanem *in vitro* tárolással valósuljon meg. Ugyanis a lúd tartása rendkívül költséges, különösen akkor, ha semmilyen bevételt nem generál a tartás. Az őshonos fajták genetikai anyagának megőrzésének fontosságáról napjainkban elég sok szó esik, ennek részletes taglalása meghaladná a dolgozat kereteit. Azonban az Intézetünkben fenntartott őshonos magyar lúdállomány hímvarsejt, blasztodermális sejt és ősvarsejt mintái elhelyezésre kerültek a Génbankban.

5. ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK

1. Meghatároztam, hogy a magyar lúd embriók a HH14-17 fejlődési stádiumot **69-84 óra** inkubálás után érik el. Ez az az időszak, amikor a leghatékonyabb az őssejtek bejuttatása.
2. Ősivarsejt-specifikus immunfestéssel igazoltam, hogy az EG&K X. stádiumú (frissen tojt) lúdtojásból kinyert blasztodermális sejtszuspenzió tartalmaz ősivarsejteket (PGC) is.
3. Ősivarsejt-specifikus immunfestéssel igazoltam, hogy a 69-84 órát inkubált embrió véráramában megtalálhatóak a vándorló ősivarsejtek.
4. Kidolgoztam egy új kiméra előállítási módszert, a blasztodermális sejtek intrakardiális injekcióját 3 napos embrió szívcsövébe, amely költséghatékony, és nem igényel nagyon bonyolult és drága labor felszereltséget. Megállapítottam, hogy az injekció optimális időszaka lúd fajban **74-76 óra** inkubációs idő közé tehető.
5. Az általam kidolgozott módszer segítségével ivarszervi kiméra egyedeket állítottam elő magyar lúd fajtában, a kimérizmust molekuláris genetikai markerek segítségével igazoltam.

6. AZ ÉRTEKEZÉS TÉMAKÖRÉBEN MEGJELENT KÖZLEMÉNYEK

Impakt faktoros tudományos szakcikkek:

Sztán, N., Patakiné Várkonyi, E., Liptói, K., Barna, J. (2012): Baromfifajok embrionális sejtjeinek kezelésével szerzett tapasztalatok/Observations of embryonic cell manipulations in different poultry species **MAGYAR ÁLLATORVOSOK LAPJA**:(8) pp. 475-481. **Q3, IF: 0.108**

Patakiné Várkonyi, E., Horváth, G., **Sztán, N.**, Váradi, É., Barna, J. (2012): Vitrification of Early Avian Blastodermal Cells with a New Type of Cryocontainer **ACTA VETERINARIA HUNGARICA** 60: (4) pp. 501-509. Doi: <https://doi.org/10.1556/avet.2012.044> **Q2, IF: 1.202**

Patakiné Várkonyi, E., Molnár, M. **Sztán, N.**, Váradi, É., Végi, B., Pusztai, P. (2016): Egy értékes hazai baromfifajtánk, a magyar parlagi gyöngytyúk (*Numida meleagris*) embrionális blasztodermasejtjeinek mélyhűtése génmegőrzés céljából / Cryopreservation of embryonic blastodermal cells of a valuable domestic poultry breed, the Hungarian landrace guinea fowl (*Numida meleagris*) as a biodiversity preservation method **MAGYAR ÁLLATORVOSOK LAPJA** 138/11: pp. 673-680. **Q4, IF: 0.031**

Sztán, N., Lázár, B., Bodzsár, N., Végi, B., Liptói, K., Pain, B., Patakiné Várkonyi, E. (2017): Successful chimera production in the Hungarian goose (*Anser anser domestica*) by intracardiac injection of blastodermal cells in 3-day-old embryos. **REPRODUCTION, FERTILITY AND DEVELOPMENT**. Doi: 10.1071/RD16289. **Q1, IF: 2.656**

Molnár, M., Lázár, B., **Sztán, N.**, Végi, B., Drobnyák, Á., Tóth, R., Liptói, K., Marosán, M., Gócza, E., Nandi, S., McGrew, M. J., Patakiné Várkonyi, E. (2019): Investigation of the Guinea fowl and domestic fowl hybrids as potential surrogate hosts for avian cryopreservation programmes. **SCIENTIFIC REPORT**, <https://doi.org/10.1038/s41598-019-50763-3>. **D1, IF:4.585**

Lázár, B., Molnár, M., **Sztán, N.**, Végi, B., Drobnyák, Á., Tóth, R., Tokodyné Szabadi, N., McGrew, M. J., Gócza, E., Patakiné Várkonyi, E. (2021): Successful cryopreservation and regeneration of a Partridge coloured Hungarian native chicken breed using primordial germ cells. **POULTRY SCIENCE** <https://doi.org/10.1016/j.psj.2021.101207> **D1 IF: 3.352**

Egyéb szakcikkek:

Pálinkás-Bodzsár, N., Sztán, N., Edviné Meleg, E., Hidas, A. (2021): Molekuláris genetikai vizsgálatok őshonos magyar baromfi fajtákon a génmegőrzés tekintetében *In: ÁLLATTENYÉSZTÉS ÉS TAKARMÁNYOZÁS* (0230-1814): 70 3 175-184. p.

Az értekezés témájában íródott könyvfejezet:

Patakiné Várkonyi, E., Gócza, E., Lázár, B., **Sztán, N.**, (2017): **Mindkét ivar megőrzése embrionális sejtek segítségével különböző baromfifajokban.** *In: Szalay István (szerk.) Génbanki kutatások régi haszonállataink védelmében: Műhelytanulmányok a tudományos génmegőrzés tárgyköréből.* 214p. Budapest; Gödöllő: Haszonállat-génmegőrzési Központ, 2017, pp.113-122. (ISBN 978-963-286-729-8)

Konferenciakiadványban megjelent közlemények:

Sztán, N., Bodzsár, N., Liptói, K., Hidas, A. (2010): Biotechnológiai módszerek alkalmazása a tyúk fajban genetikai diverzitás megőrzése céljából. *In: előadás: Genetikai Műhelyek Magyarországon, IX. Minikonferencia, Szeged, 2010.09.03.* Megjelenés: Magyarország

Patakiné Várkonyi, E.; **Sztán, N.**, Hidas, A., Virág, Gy., Váradi, É., Bodzsár, N., Barna, J. (2011) :A házityúk-kiméra előállítás hatékonyságának fokozása a blasztodermális sejt-transzplantáció optimális idejének meghatározásával. *In: Hohol Róbert (szerk.) IX. Magyar Genetikai Kongresszus és XVI. Sejt- és Fejlődésbiológiai Napok: Program, összefoglalók* Konferencia helye, ideje: Siófok, Magyarország 2011.03.25.-2011.03.27. Budapest: Diamond Congress Kft., 157-157 p. Paper P034.

Sztán, N., Patakiné Várkonyi, E., Liptói, K., Barna, J. (2011): Embrionális sejtmanipulációk tapasztalatai baromfi fajokban. *In: 17. Szaporodásbiológiai Találkozó: Az állattenyésztés és szaporodásbiológia helye és szerepe a magyar agrárstratégiában* Konferencia helye, ideje: Herceghalom, Magyarország 2011.10.28.-2011.10.29. 27-27. p.

Sztán, N. (2012): Ivarszervi kiméra előállítása blasztodermális sejtek injektálásával különböző baromfi fajokban. előadás: *In: Genetikai Műhelyek Magyarországon XI. minikonferencia, Szeged, 2012. 09. 14.* Megjelenés: Magyarország

Barna, J., Liptói, K., Patakiné Várkonyi, E., Hidas, A., Váradi, É., Bodzsár N., **Sztán, N.**, Horváth, G., Gál, J., Forgács, B., Almási, A. (2013): Development of avian reproductive biotechnologies for the management of genetic diversity. In: *Proceedings of the 8th European Symposium on Poultry Genetics* Konferencia helye, ideje: Venice, Olaszország, 2013.09.25. - 2013.09.27. Venice: World's Poultry Science Association (WPSA), 72-72. p.

Barna, J., Patakiné Várkonyi, E., Liptói, K., Váradi, É., **Sztán, N.** (2013): Asszisztált reprodukciós eljárások baromfi és vadmadarak génmegőrzésének céljából. In: *előadás: 19. Szaporodásbiológiai Találkozó és X. Kaposvári Állategészségügyi Nap, Hévíz, 2013. 10. 11-12.* Megjelenés: Magyarország

Sztán, N., Patakiné Várkonyi, E., Bodzsár, N., Fejszák, N., Liptói, K., Barna, J. (2013): Preliminary study on intra-cardiac blastodermal cell transfer in goose species. In: *Proc. of International Forum on Avian Germplasm* Konferencia helye, ideje: Seoul, Dél-Korea 2013.10.25. -2013.10.28. Seoul: 39-40

Barna, J., Patakiné Várkonyi, E., Liptói, K., **Sztán, N.**, Váradi, É. (2013): Present situation in bio-banking management of indigenous poultry species in Hungary. In: *Proc. of International Forum on Avian Germplasm* Konferencia helye, ideje: Seoul, Dél-Korea 2013.10.25. - 2013.10.28. Seoul: 60-62 p.

Patakiné Várkonyi, E., **Sztán, N.**, Liptói, K., Váradi, É., Barna, J. (2013): Efforts to conserve poultry genome by various treatments of early blastodermal cells. In: *Proc. of International Forum on Avian Germplasm* Konferencia helye, ideje: Seoul, Dél-Korea 2013.10.25. - 2013.10.28. Seoul: 37-38 p.

Sztán, N., Patakiné Várkonyi, E., Bodzsár, N., Fejszák, N., Liptói, K., Barna, J. (2014): Adaptation of intra-cardiac blastodermal cell injection methodology to Hungarian goose. In: *Birger Svihus (szerk.) Proceedings of XIVth European Poultry Conference* Konferencia helye, ideje: Stavanger, Norvégia 2014.06.23.-2014.06.27. (World's Poultry Science Association (WPSA) Stavanger: World's Poultry Science Association (WPSA), Paper P263. 4 p.

Barna, J.; Patakiné Várkonyi, E., Liptói, K., **Sztán, N.**, Váradi, É, Végi, B., Kovács, J., Szalay, I. (2014): Commercial poultry production and conservation techniques on old, local poultry breeds in Hungary. In: *XXVI International Poultry Symposium PB WPSA: Science for poultry practice - poultry practice for science* Konferencia helye, ideje: Kazimierz Dolny, Lengyelország 2014.09.08.-2014.09.10. Kazimierz Dolny: World's Poultry Science Association (WPSA), 22. 1 p.

Barna, J., Patakiné Várkonyi, E., Váradi, É., **Sztán, N.**, Drobnyák, Á. (2014): Hazai *in vitro* génbank kialakítása Gödöllőn. In: *Biszkup Miklós (szerk.) 20. Szaporodásbiológiai Találkozó* Konferencia helye, ideje: Herceghalom, Magyarország 2014.11.07.-2014.11.08. Gödöllő: 16. 1 p.

Lázár, B., Tóth, R., **Sztán, N.**, Molnár, M., Végi, B., Drobnyák, Á., Patakiné Várkonyi, E., Gócza, E. (2018): Őshonos házityúk fajtánk génmegőrzése ősvarsejtek felhasználásával. In: *Szerkesztő: Dr. Szalay István: A Kárpát-medencei őshonos haszonállatfajok, fajták és ökotípusok XXI. századi génbanki stratégiájának tudományos megalapozása és fejlesztése* Gödöllő, HÁGK, 2018. június 7. - GÉNNET-21, előadás Megjelenés: Magyarország

Molnár, M., Lázár, B., **Sztán, N.**, Drobnyák, Á., Végi, B., Liptói, K., Barna, J., Patakiné Várkonyi, E. (2018): The use of infertile interspecific hybrids for a novel model of PGC reintroduction applicable in gene preservation for poultry. In: *Estella Prukner-Radovic; Helga Medic (szerk.) WORLD'S POULTRY SCIENCE JOURNAL: The XVth European Poultry Conference, Conference Information and Proceedings*. Konferencia helye, ideje: Dubrovnik, Horvátország 2018.09.17.-2018.09.21. Dubrovnik: World's Poultry Science Association (WPSA), 462-462. p.

Lázár, B., Tóth, R., Anand, M., **Sztán, N.**, Molnár, M., Végi, B., Drobnyák, Á., Patakiné Várkonyi, E., Gócza, E. (2018): Successful biobanking of an indigenous chicken breed with cryopreserved primordial germ cell lines. In: *POULTRY SCIENCE* (0032-5791 1525-3171): 97 E-Supplement 2. 16-16 p. *PSA Latin American Scientific Conference*. Konferencia helye, ideje: Campinas, Brazília 2018.11.06.-2018.11.08. (Poultry Science Association)

Molnár, M., Lázár, B., **Sztán, N.**, Drobnyák, Á., Végi, B., Liptói, K., Gócza, E., Patakiné Várkonyi, E., (2019): Az ősvarsejt alapú génmegőrzésben alkalmazható steril interspecifikus baromfi hibrid előállítása In: *25. Szaporodásbiológiai Találkozó. Konferencia helye, ideje: Balatonkenese, Magyarország, 2019.11.08.-2019.11.09. (Szaporodásbiológiai Társaság) Herceghalom: Szaporodásbiológiai Társaság, 24. p.*

Sztán, N., Lázár, B., Molnár, M., Liptói, K., Patakiné Várkonyi, E. (2021): Determination the time of the "window" period and confirming the presence of primordial germ cells for elaboration a combined method for production germline chimera in the Hungarian goose (*Anser anser domestica*) species. In: *2nd Conference of the Visegrád Group Society for Developmental Biology: Abstracts Oral and Poster presentations*. Konferencia helye, ideje: Szeged, Magyarország, 2021.09.02.-2021.09.05. (Magyar Genetikusok Egyesülete) Budapest: Magyar Genetikusok Egyesülete, 20-20. p. Paper P5.

Molnár, M., Lázár, B., **Sztán, N.**, Végi, B., Drobnyák, Á., Gócza, E., McGrew, M., Várkonyi, E., (2021): Interspecies hybrids as potential surrogate hosts for avian cryopreservation programmes; investigation of the hybrids obtained from crossing Guinea fowl and domestic fowl. *In: 2nd Conference of the Visegrád Group Society for Developmental Biology: Abstracts Oral and Poster presentations* Konferencia helye, ideje: Szeged, Magyarország 2021.09.02.-2021.09.05. (Magyar Genetikusok Egyesülete) Budapest: Magyar Genetikusok Egyesülete, 20-20. p. Paper P4.

Molnár, M., Lázár, B., **Sztán, N.**, Várkonyi, E. (2021): Baromfifajok *in vitro* génmegőrzésének lehetőségei ősvarsejtek felhasználásával. *In: XXXII. Vándorgyűlés: Program és összefoglalók. 2021. november 25-26.* Konferencia helye, ideje: Tápiószele, Magyarország 2021.11.25.-2021.11.26. (Nemzeti Biodiverzitás- és Génmegőrzési Központ, Magyar Biológiai Társaság): Magyar Biológiai Társaság, 20-20. p.