

DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

NAGY KATALIN
KAPOSVÁRI CAMPUS
2026



MAGYAR AGRÁR- ÉS ÉLETTUDOMÁNYI EGYETEM

***IN VITRO* ELŐÁLLÍTOTT, HŐSTRESSZNEK KITETT
SZARVASMARHA EMBRIÓK MOLEKULÁRIS
KARAKTERIZÁLÁSA**

Nagy Katalin

Kaposvár

2026

[DOI azonosító]

A doktori iskola

megnevezése: Agrár- és Élelmiszertudományok Doktori Iskola

tudományága: Állattenyésztési tudományok

vezetője: **Dr. Kovács Melinda**

egyetemi tanár, az MTA rendes tagja

Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem, Élettani és Takarmányozástani
Intézet, Élettani és Állategészségügyi Tanszék

A doktori program

megnevezése: Állattudományi Program

Témavezető(k): **Dr. Gócza Elen**

tudományos tanácsadó, MTA levelező tagja

Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem, Genetika és Biotechnológia
Intézet, Állatbiotechnológia Tanszék

Dr. Zomborszky Zoltán

Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem, címzetes egyetemi tanár
Kaposvár

.....
Az programvezető jóváhagyása

Dr. Szabó András

.....
A témavezető jóváhagyása

Dr. Gócza Elen

.....
A témavezető jóváhagyása

Dr. Zomborszky Zoltán

Nyilatkozat

Alulírott Nagy Katalin,

az *IN VITRO* ELŐÁLLÍTOTT, HŐSTRESSZNEK KITETT SZARVASMARHA EMBRIÓK MOLEKULÁRIS KARAKTERIZÁLÁSA című dolgozat készítője, nyilatkozom, hogy a dolgozat készítése során az MTA hatályos Tudományetikai Kódexe alapján, a tématerületemen szükséges kutatási normák és engedélyek tudatában és birtokában jártam el. Ahol nem a saját gondolataim és a saját eredményeim jelennek meg az értekezésben, azt egyértelműen és azonosítható módon jeleztem az értekezésben.

.....
Doktorjelölt

TARTALOMJEGYZÉK

JELÖLÉSEK ÉS RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	6
1. BEVEZETÉS	9
2. A DISSZERTÁCIÓ CÉLKITŰZÉSEI.....	11
2.1. A kontrollált hőkezelés embriófejlődésre és kriotoleranciára gyakorolt hatásának vizsgálata	11
2.2. A kontrollált hőkezelés által kiváltott génexpressziós változások vizsgálata friss és krioprezervált embriókban	11
2.3. A kontrollált hőkezelés sejtszintű hatásainak vizsgálata.....	11
2.4. A kontrollált hőkezelés és a krioprezerváció hatásának vizsgálata prolongált embriótenyésztés során.....	11
2.5. Hipotézisek	12
3. IRODALMI ÁTTEKINTÉS	13
3.1. <i>In vitro</i> embrió-előállítás	13
3.2. A hőstressz.....	16
3.2.1. A hőstressz mérése és élettani hatásai	16
3.2.2. A hőstressz hatása a nőivarú szarvasmarhák reprodukciójára.....	19
3.2.3. A hőstressz hatása a tüszőérésre	20
3.2.4. A petesejtek hőérzékenysége	21
3.2.5. Az embriók hőérzékenysége	22
3.2.6. Molekuláris változások hőterhelés következtében	24
3.3. Az embriók termotoleranciájának növelési lehetőségei	26
3.4. A petesejtek és embriók minőségét befolyásoló további tényezők	27
3.5. Krioprezerváció	29
3.6. A reprodukciós mutatók javítási lehetőségei hőstresszes időszakban embriótranszfer alkalmazásával	31
3.7. Prolongált embriótenyésztés.....	33
4. ANYAG ÉS MÓDSZER.....	36
4.1. <i>In vitro</i> embrió-előállítás	36
4.1.1. Petefészkek gyűjtése	36
4.1.2. Petesejtek aspirációja és <i>in vitro</i> maturációja (IVM)	36
4.1.3. <i>In vitro</i> fertilizáció (IVF)	38
4.1.4. <i>In vitro</i> embriótenyésztés (IVC)	40
4.2. Hőkezelési kísérletek.....	40

4.2.1. „A” kísérlet – Friss embriók vizsgálata	41
4.2.2. „B” kísérlet – Krioprezervált embriók vizsgálata.....	42
4.2.3. „C” kísérlet – Friss és krioprezervált embriók vizsgálata	44
4.2.4. „D” kísérlet – Prolongált embriótenyésztés.....	46
4.3. A génexpressziós vizsgálatokhoz történő mintagyűjtés	48
4.4. Génexpresszió vizsgálata.....	48
4.5. Apoptózis- és nekrozisfestés	51
4.6. Immunfestés	51
4.7. Statisztikai értékelés	52
5. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK	55
5.1. Blasztocisza és túlélési arányok elemzése.....	55
5.1.1. „A” kísérlet	55
5.1.2. „B” kísérlet	57
5.1.3. „C” kísérlet	58
5.1.4. „D” kísérlet	61
5.2. Génexpressziós mintázatok analízise	64
5.2.1. „A” kísérlet	64
5.2.2. „B” kísérlet	67
5.2.3. „C” kísérlet	70
5.3. Apoptózis-, nekrozis- és immunfluoreszcens festés.....	75
6. KÖVETKEZTETÉSEK ÉS JAVASLATOK.....	77
7. ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK	85
8. ÖSSZEFOGLALÁS.....	87
9. SUMMARY	89
10. IRODALOMJEGYZÉK.....	91
11. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS.....	114
12. PUBLIKÁCIÓS LISTA	117

JELÖLÉSEK ÉS RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

Általános rövidítések

Rövidítés	Jelentés
ACTH	adrenokortikotrop hormon (<i>adrenocorticotropic hormone</i>)
ATP	adenozin-trifoszfát (<i>adenosine triphosphate</i>)
BGHI	fekete gömb hőmérséklet-páratartalom index (<i>Black Globe Humidity Index</i>)
cDNS	komplementer DNS (<i>complementary DNA</i>)
COC	kumulusz-petesejt komplex (<i>cumulus-oocyte complex</i>)
D7	az embriótenyésztés 7. napja
D8	az embriótenyésztés 8. napja
D10	az embriótenyésztés 10. napja
D12	az embriótenyésztés 12. napja
D14	az embriótenyésztés 14. napja
DPBS	Dulbecco-féle foszfátpufferelt sóoldat (<i>Dulbecco's phosphate-buffered saline</i>)
DNS	dezoxiribonukleinsav (<i>deoxyribonucleic acid</i>)
EGA	embriónális genom aktiváció (<i>embryonic genome activation</i>)
ET	embriótranszfer (<i>embryo transfer</i>)
ETIC	szarvasmarhák ekvivalens hőmérsékleti indexe (<i>Equivalent Temperature Index for Cattle</i>)
FBS	magzati szarvasmarha szérum (<i>fetal bovine serum</i>)
FSH	follikulusstimuláló hormon (<i>follicle-stimulating hormone</i>)
GLMM	általánosított lineáris vegyes modell (<i>generalized linear mixed model</i>)
GnRH	gonadotropin-felszabadító hormon (<i>gonadotropin-releasing hormone</i>)
GV	germinális vezikulum (<i>germinal vesicle</i>)
HK	hőkezelt csoport
HKF	hőkezelt és krioprezervált csoport
HLI	hőterhelési index (<i>Heat Load Index</i>)
hpi	a termékenyítést követően eltelt idő órákban (<i>hours post insemination</i>)
HR	szívfrekvencia (<i>heart rate</i>)
HS	hősokk / hősokk-kezelés
HSP	hősokkfehérje (<i>heat shock protein</i>)
IETS	Nemzetközi Embriótechnológiai Társaság (<i>International Embryo Technology Society</i>)
IVC	<i>in vitro</i> embriótenyésztés (<i>in vitro culture</i>)
IVEP	<i>in vitro</i> embrió-előállítás (<i>in vitro embryo production</i>)
IVF	<i>in vitro</i> fertilizáció (<i>in vitro fertilization</i>)
IVM	<i>in vitro</i> maturáció (<i>in vitro maturation</i>)
IVP	<i>in vitro</i> előállított (<i>in vitro produced</i>)
K	kontrollcsoport
KF	krioprezervált kontrollcsoport
LH	luteinizáló hormon (<i>luteinizing hormone</i>)

Rövidítés	Jelentés
MII	II. metafázis (<i>metaphase II</i>)
miRNS	mikroRNS (<i>microRNA</i>)
mRNS	hírvivő RNS (<i>messenger RNA</i>)
OPU	petesejt-aspiráció (<i>ovum pick-up</i>)
PBS	foszfátpufferelt sóoldat (<i>phosphate-buffered saline</i>)
PI3K–Akt	foszfatidilinozitol-3-kináz/protein-kináz B jelátviteli útvonal
qPCR	kvantitatív polimeráz-láncreakció (<i>quantitative polymerase chain reaction</i>)
RNS	ribonukleinsav
ROS	reaktív oxigénformák (<i>reactive oxygen species</i>)
RR	légzésszám (<i>respiration rate</i>)
RT	reverz transzkripció (<i>reverse transcription</i>)
RT-qPCR	reverz transzkripció kvantitatív polimeráz-láncreakció (<i>reverse transcription quantitative polymerase chain reaction</i>)
SEM	az átlag standard hibája (<i>standard error of the mean</i>)
SOF	szintetikus petevezető folyadék (<i>synthetic oviduct fluid</i>)
SOM	önszerveződő térkép (<i>self-organizing map</i>)
THI	hőmérséklet-páratartalom index (<i>Temperature-Humidity Index</i>)
ZP	zona pellucida

Gének és molekuláris markerek

Jelölés	Megnevezés
AHSA1	activator of HSP90 ATPase activity 1
BCL-2	B-cell lymphoma 2
CCNB1	cyclin B1
CDX2	caudal type homeobox 2
COX1	cyclooxygenase 1
COX2	cyclooxygenase 2
DNMT3A	DNA methyltransferase 3 alpha
EEF1A1	eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 1
GPX1	glutathione peroxidase 1
H19	H19 imprinted maternally expressed transcript
HSP10	heat shock protein 10
HSP27	heat shock protein 27
HSP40	heat shock protein 40
HSP60	heat shock protein 60
HSP70	heat shock protein 70
HSP90	heat shock protein 90
HSP100	heat shock protein 100
HSP110	heat shock protein 110
HSP90AA1	heat shock protein 90 alpha family class A member 1

Jelölés	Megnevezés
HSPA1A	heat shock protein family A (Hsp70) member 1A
HSPA14	heat shock protein family A (Hsp70) member 14
HSPB11	heat shock protein family B (small) member 11
IGF1	insulin-like growth factor 1
IGF2R	insulin-like growth factor 2 receptor
OCT4	octamer-binding transcription factor 4
PLAC8	placenta associated 8
RPS15A	ribosomal protein S15a
XIAP	X-linked inhibitor of apoptosis

1. BEVEZETÉS

Az éghajlatváltozás következtében egyre gyakoribbá és intenzívebbé váló szélsőséges időjárási események jelentős kihívást jelentenek az állattenyésztés számára. A szarvasmarhaágazatot különösen érzékenyen érinti a környezeti hőterhelés, mivel a magas hőmérséklet és páratartalom nemcsak az állatok termelését és általános élettani állapotát befolyásolja kedvezőtlenül, hanem a reprodukciós folyamatok hatékonyságát is csökkenti. A hőstressz által kiváltott élettani és sejtszintű változások a nőivarú állatok reprodukciójának több szakaszát is érinthetik, beleértve a tüszőfejlődést, a petesejtek érését, a megtermékenyülést és a korai embriófejlődést.

A preimplantációs embriók hőterheléssel szembeni érzékenysége jelentős mértékben függ a fejlődési stádiumtól. A korai fejlődési szakaszban lévő embriók különösen érzékenyek az emelkedett hőmérséklet káros hatásaira, míg fejlődésük előrehaladtával fokozatosan növekszik a hőterheléssel szembeni ellenálló képességük. Ennek kialakulásában az embrionális genom aktiválódása, valamint a sejtszintű stresszválasz mechanizmusainak működése egyaránt szerepet játszhat. A hősokkfehérjék fokozott expressziója és más sejtszintű stresszválasz-mechanizmusok aktiválódása hozzájárulhat a sejtek homeosztázisának fenntartásához és a hőhatás következtében kialakuló károsodások mérsékléséhez.

Mindezek alapján kiemelt jelentőségű annak vizsgálata, hogy egy mérsékelt, kontrollált hőhatás milyen változásokat idéz elő a korai morula stádiumú embriókban, és ezek milyen összefüggésben állhatnak későbbi fejlődési képességükkel, valamint további stresszhatásokkal szembeni válaszreakcióikkal.

A hőterhelésre adott embrionális válasz vizsgálata során nemcsak az embriók morfológiai fejlődésének és életképességének értékelése fontos, hanem a háttérben zajló molekuláris változások feltárása is. A környezeti stresszhatások olyan molekuláris változásokat idézhetnek elő, amelyek a hagyományosan vizsgált fejlődésbiológiai paraméterekben nem feltétlenül jelennek meg azonnal. A hőstresszre adott sejtválaszban a hősokkfehérjék mellett az anyagcsere-folyamatokban, a sejtkapcsolatok fenntartásában és az epigenetikai szabályozásban részt vevő gének, valamint a poszttranszkripciós szabályozást végző mikroRNS-ek is szerepet játszhatnak. Ezen molekuláris változások vizsgálata ezért hozzájárulhat az embriókat érő mérsékelt hőterhelés hatásainak pontosabb jellemzéséhez.

Az *in vitro* előállított embriókat a tenyésztés és a későbbi felhasználás során a hőterhelés mellett további stresszhatások is érhetik. Ezek közül kiemelt jelentőségű a szarvasmarhatenyésztésben széles körben alkalmazott krioprezerváció, amely a membránok, a sejt szervecskék és az anyagcsere-folyamatok megváltozásával, valamint molekuláris válaszreakciók

kialakulásával járhat. Az *in vitro* előállított embriók kriotoleranciája ezért nemcsak gyakorlati, hanem fejlődésbiológiai szempontból is jelentős kérdés. Különösen fontos annak feltárása, hogy a krioprezervációt megelőző környezeti hatások miként befolyásolhatják az embriók fagyasztással és felolvasztással szembeni válaszát, illetve hogy a különböző stresszhatások következményei molekuláris szinten milyen módon kapcsolódhatnak egymáshoz.

Az embriók stresszhatásokra adott válaszána megítélése ugyanakkor nagymértékben függ a vizsgálati időtartamtól is. A szarvasmarha embriók *in vitro* tenyésztése hagyományosan a blasztocisza stádium eléréséig tart, ezért a később jelentkező fejlődési változások és az embriók hosszabb távú életképessége a rutinszerű tenyésztési rendszerekben csak korlátozottan vizsgálható. A blasztocisza stádiumon túl folytatott, prolongált *in vitro* tenyésztés lehetőséget biztosíthat az embriók életképességének nyomon követésére, ezáltal a korábban elszenvedett környezeti vagy technológiai stresszhatások későbbi következményeinek vizsgálatára.

Mindezek fényében a szarvasmarha embriók hőterhelésre adott válaszána komplex vizsgálata nemcsak a közvetlen fejlődési következmények, hanem a molekuláris és sejtszintű változások szempontjából is indokolt. A korai morula stádiumban alkalmazott mérsékelt, kontrollált hőhatás következményeinek, valamint a későbbi stresszhatásokkal szembeni érzékenység összefüggéseinek feltárása hozzájárulhat az embrionális stresszválasz mechanizmusainak átfogóbb megértéséhez, és ezáltal az *in vitro* embrió-előállítás és a krioprezerváció során alkalmazott eljárások további fejlesztéséhez.

2. A DISSZERTÁCIÓ CÉLKITŰZÉSEI

Vizsgálataink során a korai morula stádiumban alkalmazott kontrollált hőkezelés *in vitro* előállított szarvasmarha embriókra gyakorolt hatását tanulmányoztuk. A kísérletek során a hőkezelés embriófejlődésre, sejtszintű változásokra, génexpresszióra, kriotoleranciára, valamint a prolongált *in vitro* tenyésztés során megfigyelhető életképességre gyakorolt hatását vizsgáltuk. A disszertáció négy egymásra épülő kísérlet eredményeit mutatja be, amelyek eltérő megközelítésből járultak hozzá a hőkezelés hatásmechanizmusának komplex értékeléséhez.

2.1. A kontrollált hőkezelés embriófejlődésre és kriotoleranciára gyakorolt hatásának vizsgálata

Célunk annak vizsgálata volt, hogy a korai morula stádiumban alkalmazott kontrollált hőkezelés milyen hatást gyakorol az *in vitro* előállított szarvasmarha embriók fejlődésére, valamint a krioprezervációt követő túlélésére.

2.2. A kontrollált hőkezelés által kiváltott génexpressziós változások vizsgálata friss és krioprezervált embriókban

Vizsgálataink célja annak meghatározása volt, hogy a korai morula stádiumban alkalmazott kontrollált hőkezelés miként befolyásolja a vizsgált gének expresszióját friss, valamint krioprezervált és felolvasztott *in vitro* előállított szarvasmarha embriókban.

2.3. A kontrollált hőkezelés sejtszintű hatásainak vizsgálata

Vizsgálataink célja a hőkezelés sejtszintű hatásainak értékelése volt, különös tekintettel az apoptózis és nekrosis kvalitatív értékelésére, valamint a belső sejttömeg és a trofektoderma sejteinek immunfluoreszcens jelölésen alapuló vizsgálatára.

2.4. A kontrollált hőkezelés és a krioprezerváció hatásának vizsgálata prolongált embriótenyésztés során

Vizsgáltuk továbbá, hogy a hőkezelés és a krioprezerváció miként befolyásolja az *in vitro* előállított szarvasmarha blasztociszták életképességét hosszú távú *in vitro* tenyésztési körülmények között.

2.5. Hipotézisek

A 2. fejezetben megfogalmazott célkitűzések alapján, a szakirodalmi előzményeket figyelembe véve az alábbi munkahipotéziseket fogalmaztam meg, amelyeket a négy kísérlet eredményei alapján értékeltem.

H1 – Fejlődés és kriotolerancia vizsgálata („A”, „B” és „C” kísérlet).

A korai morula stádiumban, 38,8 °C-ról 40,0 °C-ra fokozatosan emelt, majd két órán át fenntartott kontrollált hőkezelés nem csökkenti szignifikánsan az *in vitro* előállított szarvasmarha embriók blasztociszta-arányát, sem a lassú fagyasztást követő túlélési arányát, mivel az embrionális genom aktivációját követően a morula stádiumú embriók hőtűrése megnő (Sakatani, 2017; Oliveira *et al.*, 2021).

H2 – Molekuláris válasz vizsgálata friss embriókban („A” és „C” kísérlet).

A kontrollált hőkezelés a fejlődési kompetencia romlása nélkül is mérhető változást idéz elő a stresszhez kapcsolódó gének (*HSP90AA1*, *HSPB11*, *HSPA1A*) és miRNS-ek (miR-191-5p, miR-378a-3p, miR-138-5p) expressziójában, vagyis a molekuláris markerek érzékenyebben jelzik az enyhe hőterhelést, mint a fejlődésbiológiai mutatók (Sakatani *et al.*, 2013; Sengar *et al.*, 2018).

H3 – Kombinált hő- és kriogén stressz vizsgálata („B” és „C” kísérlet).

A krioprezervációt megelőzően alkalmazott kontrollált hőkezelés módosítja az embriók fagyasztásra adott molekuláris válaszát: a felolvasztást követően a hőkezelt embriókban a hősokkfehérjéket kódoló gének – elsősorban a *HSPA1A* – expressziója magasabb, mint a kizárólag krioprezervált kontrollcsoportban.

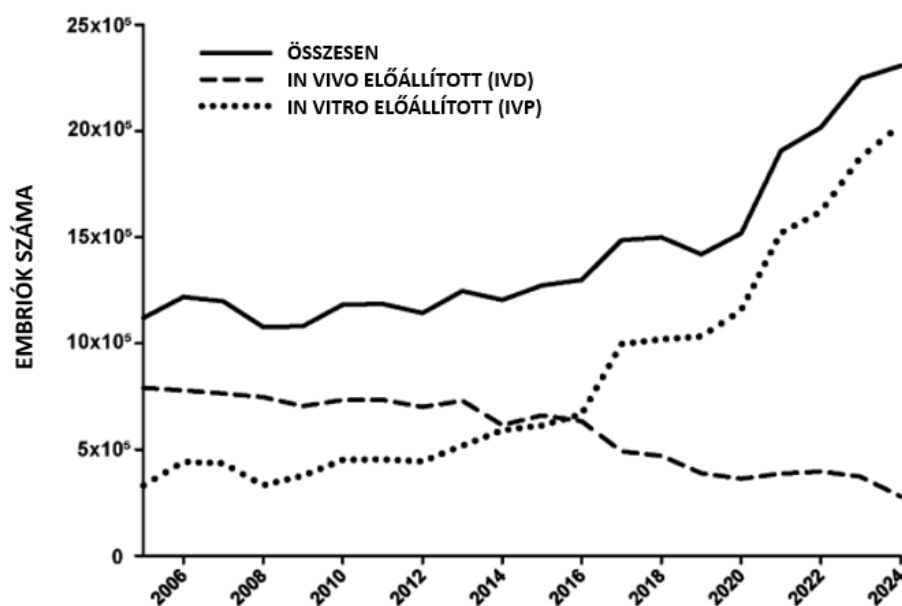
H4 – Hosszú távú életképesség vizsgálata („D” kísérlet).

A korai morula stádiumban alkalmazott kontrollált hőkezelés javítja az *in vitro* előállított szarvasmarha embriók hosszú távú, a tenyésztés 14. napjáig tartó túlélését emelt tenyésztési hőmérsékleten (39,0 és 39,5 °C), illetve krioprezervációt követően, azaz mérhető termotolerancia-növekedést eredményez.

3. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

3.1. *In vitro* embrió-előállítás

Az *in vitro* embrió-előállítás (*in vitro* embryo production, IVEP) napjainkra a szarvasmarha fajban alkalmazott asszisztált reprodukciós technikák egyik meghatározó technológiájává vált. A technológia térnyerését jól szemlélteti, hogy a kereskedelmi célból *in vitro* módon előállított embriók száma 2012 óta folyamatos növekedést mutat, és 2024-ben világszerte meghaladta a kétmilliót, míg az *in vivo* eredetű embriók száma továbbra is 300 ezer alatt maradt (1. ábra) (Viana, 2025).



1. ábra. A világon előállított szarvasmarha embriók számának alakulása 2005 és 2024 között (Viana, 2025)

Az elmúlt évtizedben a kereskedelmi célú *in vitro* embrió-előállítás (IVEP) hatékonysága számottevően javult. Ezt a magasabb blasztociszta-arány, a fokozott kriotolerancia, a jobb vemhesülési eredmények, valamint a vemhességvesztés csökkenése egyaránt alátámasztja. Ennek ellenére az *in vitro* előállított embriók még mindig eltérnek *in vivo* fejlődött társaiktól (Hansen, 2020a). *In vitro* körülmények között a petesejtek hozzávetőlegesen 80–90%-a éri el a nukleáris érettséget, mintegy 80% megtermékenyül, 30–40% fejlődik blasztocisztává, míg az átültetett embriók körülbelül fele ágyazódik be (Galli *et al.*, 2014; Lonergan–Fair, 2016; Wrenzycki, 2016).

A petesejt érése összetett, szigorúan szabályozott biológiai folyamat, amely a nukleáris és citoplazmatikus érési események összehangolt lezajlásán, valamint epigenetikai átrendeződésen keresztül biztosítja a megtermékenyülésre való alkalmasságot, valamint a korai embriófejlődés feltételeit (He *et al.*, 2021; Mtango *et al.*, 2008). A nukleáris érés a meiózis újraindulását és

végbemenetelét foglalja magában. A folyamat első morfológiai jele a germinális vezikulum lebomlása, amelyet követően a petesejt a meiózis I. profázisából a II. metafázisig (MII) fejlődik, miközben megtörténik az első sarki test kilökődése (Kruip *et al.*, 1983; Moawad és Choi, 2025). A citoplazmatikus érés során metabolikus és szerkezeti változások mennek végbe, amelyek magukban foglalják a fehérjék, a hírvivő RNS-ek (mRNS-ek) és a sejtorganellek felhalmozódását (Giaccari *et al.*, 2024). Az epigenetikai módosulások – elsősorban a DNS-metiláció és a hisztonmódosítások – meghatározó szerepet töltenek be a korai embriófejlődés során zajló génexpresszió szabályozásában (Dvoran *et al.*, 2022). A három folyamat párhuzamosan zajlik, és szoros kölcsönhatásban áll egymással. E folyamatok bármelyikének akár csekély mértékű zavara is negatívan befolyásolhatja a petesejtminőséget, ami kedvezőtlen hatással lehet a későbbi embriófejlődésre (Hallberg *et al.*, 2026). *In vitro* körülmények között a nukleáris érés általában 20–24 óra alatt lezajlik, így a petesejtek alkalmassá válnak a megtermékenyülésre (Ferre *et al.*, 2020; Leibfried-Rutledge *et al.*, 1987). Optimális *in vitro* érlelési (IVM) körülmények között az éretlen petesejtek mintegy 85–90%-a éri el a meiózis II. metafázisát. Bár ez az arány kedvezőnek tekinthető, a nukleáris érés önmagában nem garantálja a citoplazmatikus érés teljes lezajlását és a további fejlődés lehetőségét (Watson, 2007).

Az *in vitro* érlelés befejezését követően a petesejtek és a spermiumok 18–24 órán át tartó koinkubációja során lezajlik az *in vitro* termékenyítés (IVF) (Gordon, 2003). Bár a legtöbb laboratóriumban a gamétákat általában 18 órán át inkubálják együtt, a megtermékenyülési folyamatok döntő többsége már az első 12 órában lezajlik (Hasler–Barfield, 2021). Az IVF során a spermium-petesejt kölcsönhatás kis térfogatú tenyésztőközegben megy végbe. Ovum pick-up (OPU) során kinyert, kisebb számú petesejt esetében jellemzően 50–100 μ L-es, míg vágóhídról származó, nagy számban gyűjtött petesejt esetében többnyire 400 μ L-t meghaladó térfogatú fertilizációs közeget alkalmaznak (Gordon, 2003). A spermiumokat általában sűrűséggradiens-centrifugálással vagy swim-up technológiával készítik elő, amelynek célja a krioprotektív anyagok, az ondóplazma, a sejttermelék és az elhalt spermiumok eltávolítása, valamint a legjobb motilitású spermiumok szelekciója. Ezt követően a spermiumokat kapacitációt elősegítő faktorokkal kezelik, hogy képessé váljanak a zona pellucida (ZP) penetrációjára (Parrish *et al.*, 1986). Az *in vitro* kapacitáció elősegítésére speciális fertilizációs közegeket fejlesztettek ki. A fertilizáció során alkalmazott médiumok pH-ja rendszerint magasabb (7,5), mint az *in vitro* érleléshez és az embriótenyésztéshez (IVC) használt közegeké (7,3) (Hasler–Barfield, 2021). IVF során leggyakrabban Tyrode- vagy Krebs-Ringer-oldatot alkalmaznak, amelyet energiaforrásokkal (glükóz, laktát és piruvát), valamint albuminnal egészítenek ki (Yanagimachi, 1994). A fertilizációs közegek legfontosabb kapacitációt elősegítő összetevője a heparin, amely elősegíti a spermiumok kapacitációját azáltal, hogy a spermium felszínén található fehérjékhez

kötődve hozzájárul az ondóplazma-komponensek eltávolításához, valamint serkenti a koleszterin és a foszfolipidek kiáramlását a plazmamembránból (Breininger *et al.*, 2010). Bár az optimális spermiumkoncentráció a bika fertilitásától és a laboratóriumi protokolltól függően változhat, a legtöbb protokollban továbbra is $1\text{--}2 \times 10^6$ spermium/mL koncentráció alkalmazása tekinthető általános gyakorlatnak. Magas fertilitású bikák esetében azonban ennél alacsonyabb koncentráció is megfelelő fertilizációs eredményeket biztosíthat (Ferré *et al.*, 2020; Ward *et al.*, 2002). A petesejtek *in vitro* érlelését és fertilizációját a legtöbb hagyományos protokollban 5% CO₂-t tartalmazó, légköri oxigénkoncentrációjú ($\approx 20\text{--}21\%$ O₂) inkubációs környezetben végzik (Bermejo-Álvarez *et al.*, 2010; Krisher–Herrick, 2024). Az IVF sikeressége rendszerint a termékenyítést követő 48 órában meghatározott osztódási aránnyal jellemezhető. Amennyiben partenogenetikus aktiváció nem történik, ez az érték rendszerint 70–85% között alakul (Ferré *et al.*, 2020).

Az *in vitro* embriótenyésztés (IVC) az *in vitro* embrió-előállítás folyamatának utolsó lépése, melynek során a megtermékenyítést követően kialakult egysejtes zigótákat hat, bizonyos esetekben hét napon át tenyésztik, egészen a blasztocisza stádium eléréséig. A szarvasmarha-embriók *in vitro* tenyésztésére hosszú időn keresztül elsősorban a Tervit és munkatársai (1972) által kifejlesztett szintetikus petevezető folyadék (synthetic oviduct fluid, SOF) különböző módosított változatait alkalmazták. Az eredeti formulát az évek során számos alkalommal módosították, elsősorban aminosavakkal, valamint egyes protokollokban alacsony koncentrációjú szérummal történő kiegészítéssel az embriófejlődés javítása érdekében. Napjainkban a SOF továbbra is az egyik legelterjedtebben alkalmazott embriótenyésztő közeg, a CR1aa és a KSOM mellett (Krisher–Herrick, 2024; Lane *et al.*, 2003; Men, 2024). A SOF-alapú embriótenyésztés során alkalmazható egyetlen, a teljes tenyésztési időszak alatt változatlan összetételű közeg, illetve két- vagy háromlépcsős, úgynevezett szekvenciális tenyésztési rendszer is, amelyben a tenyésztőmédium összetételét a fejlődés meghatározott szakaszaiban módosítják. Ezen rendszerek célja az *in vivo* környezet minél pontosabb modellezése azáltal, hogy a tenyésztőmédium összetételét az embrió fejlődési stádiumának megfelelően módosítják, utánozva a petevezetőből a méhbe történő eljutás során bekövetkező fiziológias környezeti változásokat (Hasler–Barfield, 2021). A szarvasmarha embriók *in vitro* tenyésztése során széles körben alkalmaznak csökkentett oxigénkoncentrációjú (5% O₂, 5% CO₂ és 90% N₂) inkubációs környezetet, mivel jobban megközelíti az *in vivo* reprodukzív traktus fiziológias viszonyait (Sciorio–Smith, 2019). Általánosságban elmondható, hogy a tenyésztés során a zigóták általában 20–40%-a éri el a blasztocisza stádiumot (Hasler–Barfield, 2021; Rizos *et al.*, 2008). A blasztocisza stádium elérését követően az embriók az *in vivo* előállított blasztocisztákhoz hasonló eljárással recipiens állatokba ültethetők át, vagy későbbi felhasználás céljából lefagyaszthatók (Ferré *et al.*, 2020).

A korszerű inkubátorokban a korábban alkalmazott, nagy térfogatú (>150 l) inkubációs kamrákat kis térfogatú (<500 mL) kamrák váltották fel. Ezek a berendezések több, egymástól független inkubációs kamrával rendelkeznek, amelyek külön hőmérséklet-, esetlegesen CO₂- és O₂-szabályozással működnek. Ennek köszönhetően az egyes kamrák környezeti feltételei önállóan szabályozhatók, valamint az ajtónyitást követően a beállított inkubációs paraméterek gyorsabban helyreállnak (Kelly–Cho, 2014). A többkamrás inkubátorokba integrált kamerarendszerrel ellátott time-lapse rendszerek lehetővé teszik az embriók fejlődésének folyamatos, megszakítás nélküli nyomon követését. Ennek köszönhetően pontosabb információ nyerhető a fejlődés dinamikájáról, valamint az egyes fejlődési stádiumokban jelentkező morfológiai eltérésekről (Kovacs, 2014; Magata, 2023).

3.2. A hőstressz

A hőstressz olyan fiziológiai állapotként értelmezhető, amely akkor alakul ki, amikor a szervezetet érő összes hőterhelés meghaladja az állat hőleadó képességét. Ez a szervezet hőegyensúlyának felborulásához és a homeosztázis fenntartásának zavarához vezet, melynek következményeként emelkedik a testhőmérséklet, és számos élettani, anyagcsere- és sejtszintű válaszmechanizmus aktiválódik (Gupta *et al.*, 2024). A hőstresszre adott válasz mértékét számos tényező befolyásolja, többek között az adott faj és fajta genetikai sajátosságai, az életkor, a termelési szint, valamint a tartási és takarmányozási körülmények (Sejian *et al.*, 2018). Bár a hőstressz valamennyi haszonállatfajt érinti, gazdasági jelentősége és biológiai következményei különösen a szarvasmarha-ágazatban kiemelkedőek, ahol a magas termelési szint fokozott hőterheléssel szembeni érzékenységgel társul (Erasmus–van Marle-Köster, 2025; Oliveira *et al.*, 2025).

3.2.1. A hőstressz mérése és élettani hatásai

Az állatokat érő környezeti hőterhelés, valamint a hőstressz kockázatának értékelésére a hőmérséklet-páratartalom index (Temperature-Humidity Index, THI) napjainkban is széles körben alkalmazott bioklimatikus mutató (Messerli *et al.*, 2023; Oliveira *et al.*, 2025). A THI egyetlen numerikus értékben fejezi ki a levegő hőmérsékletének és relatív páratartalmának együttes hatását (Yan *et al.*, 2021). A THI növekedésével a szarvasmarhák élettani, termelési és reprodukciós mutatói fokozatosan változnak, azonban az egyes válaszreakciók megjelenésének küszöbértékei eltérőek. Mader és munkatársai (2006) szerint a 70 és 74 közötti THI-értékek már potenciális hőstresszes környezeti feltételeket jelentenek a szarvasmarhák számára. Az elmúlt évtizedekben végzett vizsgálatok jelentős eltéréseket mutattak a tejtermelés csökkenéséhez tartozó THI-küszöbértékek tekintetében: egyes tanulmányok szerint a tejhozam romlása THI = 72 (Bohmanova

et al., 2007), THI = 68 (Herbut *et al.*, 2015), THI = 65 (Zimbelman–Collier, 2011), illetve akár már THI = 60 (Brügemann *et al.*, 2012) értéknél is megfigyelhető. Hasonlóképpen, Morton és munkatársai (2007) a napi maximális THI legalább 72-es értéke, míg Schüller és munkatársai (2014) az átlagos THI legalább 73-as értéke esetén írták le a vemhesülési arány csökkenését, míg a kérődzési idő csökkenését THI = 76 értéknél figyelték meg (Soriani *et al.*, 2013). Számos vizsgálat rámutatott arra, hogy a THI alapú előrejelzések jelenleg alábecsülik a hőstressz élettani válaszokra gyakorolt súlyosságát tejelő tehenekben (Herbut *et al.*, 2019). Ugyanakkor ez az index nem veszi figyelembe az állatok egyedi tulajdonságait és élettani sajátosságait, amelyek elengedhetetlenek a környezeti feltételek átfogó értékeléséhez (Oliveira *et al.*, 2025). Az olyan élettani paraméterek, mint a légzésszám (respiration rate, RR), a szívfrekvencia (heart rate, HR) és a testhőmérséklet, megfelelő és gyorsan reagáló indikátoroknak bizonyultak a hőstressz kimutatásában (da Costa *et al.*, 2015). Pinto és munkatársai (2020) nagy tejtermelésű Holstein-fríz teheneken végzett vizsgálatukban ezen élettani paraméterek változásait elemezték a THI érték változásának függvényében. Eredményeik szerint a légzésszám fekvő tehenek esetében már THI = 65, míg álló teheneknél THI = 70 értéknél emelkedni kezdett. A szívfrekvencia növekedésének küszöbértéke THI = 69, a rektális hőmérsékleté pedig THI = 70 volt. A szerzők emellett kimutatták, hogy a küszöbértéket meghaladó hőterhelés időtartamának növekedésével a vizsgált élettani paraméterek értékei tovább emelkedtek, vagyis a hőstressz súlyosságát nemcsak a THI nagysága, hanem az expozíció időtartama is jelentősen befolyásolta. A légzésszám a tejelő szarvasmarhák hőstresszes állapotának egyik legérzékenyebb élettani mutatója. A hőstressz hatására szinte azonnal emelkedni kezd, mivel a lihegés a szervezet látens hőleadásának egyik leghatékonyabb mechanizmusa. Rejeb és munkatársai (2016) vizsgálatuk során nyári időszakban (THI = 83,3) 79,4 légvétel/perc, tavasszal (THI = 65,6) pedig 43,9 légvétel/perc átlagos légzésszámot regisztráltak. Szakirodalmi adatok alapján a 60 légvétel/perc alatti légzésszám még komfortos állapotnak tekinthető, a 60–80 légvétel/perc közötti értékek hőstressz kialakulására utaló figyelmeztető tartományt jelentenek, míg a 80 légvétel/perc feletti értékek már veszélyes mértékű hőterhelésre utalnak (Pacheco *et al.*, 2020). Ugyanakkor Tresoldi és munkatársai (2025) megfigyelték, hogy a légzésszámot számos állatspecifikus tényező is befolyásolhatja, többek között az életkor, a fajta, a testhelyzet, a tartási hely, a tejtermelés és a vemhesség stádiuma. A szívfrekvencia a hőstressz egyik fontos élettani indikátora, amely a perifériás vérkeringés fokozásával hozzájárul a szervezet hőleadásához. Hőstressz hatására a szívfrekvencia rendszerint emelkedik, azonban érzékenysége kisebb, mint a légzésszámé (Oliveira *et al.*, 2025). Az állatok testhőmérséklete többféle módszerrel is mérhető. A belső testhőmérséklet meghatározására alkalmazható a rektális, a vaginális, a bendő- és a dobhártyahőmérséklet mérése, míg a külső testhőmérséklet vizsgálatára többek között az infravörös termográfia szolgál. Ezeket a

módszereket számos tanulmányban alkalmazták a hőstressz értékelésére (Rejeb *et al.*, 2016; Pacheco *et al.*, 2020). Garner és munkatársai (2017) megfigyelték, hogy a hőstressznek kitett tehenek rektális és vaginális hőmérséklete szignifikánsan magasabb volt, mint termoneutrális körülmények között. Hőstressz esetén mind a rektális, mind a vaginális hőmérséklet elérte a 40,0 °C-ot, míg termoneutrális környezetben a rektális hőmérséklet 38,5 °C, a vaginális hőmérséklet pedig 38,8 °C volt. Ugyanezen vizsgálatban a szerzők a tőgy felszíni hőmérsékletében is szignifikáns különbséget mutattak ki. A hőstressznek kitett teheneknél 39,8 °C-ot, míg termoneutrális körülmények között tartott állatoknál 35,2 °C-ot mértek. Az élettani változások mellett a tejtermelés csökkenése is a hőstressz egyik jól ismert következménye és egyben fontos indikátora tejelő tehenek esetében (Hoffmann *et al.*, 2020). Ugyanakkor fontos megjegyezni, hogy a tejtermelés csökkenése nem azonnali reakció a hőstresszre, mivel a hőterhelés kialakulása és időtartama, valamint a termelés visszaesése között időbeli késés tapasztalható (Leso *et al.*, 2020).

A THI korlátainak kiküszöbölésére számos további bioklimatikus indexet fejlesztettek ki, amelyek eltérő termelési rendszerekben, tartási körülmények között és környezeti feltételek mellett alkalmazhatók. Ilyen például a Black Globe Humidity Index (BGHI), a Heat Load Index (HLI) és az Equivalent Temperature Index for Cattle (ETIC) (Buffington *et al.*, 1981; Gaughan *et al.*, 2008; Lees *et al.*, 2018a; Wijffels *et al.*, 2021; Wang *et al.*, 2018).

Alternatív megközelítésként a gépi tanuláson alapuló módszerek egyre nagyobb szerepet kapnak a tejelő tehenek hőstresszének felismerésében és előrejelzésében (Brezov *et al.*, 2023; Inadagbo *et al.*, 2024; Pacheco *et al.*, 2020). A testhőmérsékletet, a légzésszámot, a szívfrekvenciát, az aktivitást és más élettani paramétereket mérő szenzorokból származó nagyméretű adathalmazok elemzésével a gépi tanulási algoritmusok képesek azonosítani a hőstresszre utaló mintázatokat és finom változásokat. Ezek az algoritmusok nagy pontossággal képesek osztályozni és előre jelezni az állatok állapotában bekövetkező változásokat, lehetővé téve a gyorsabb és hatékonyabb beavatkozást. A valós idejű monitorozó rendszerek és a prediktív modellek integrálásával a termelők már a hőstressz állategészségügyi és termelési következményeinek kialakulása előtt módosíthatják a környezeti és menedzsmentfeltételeket (Chung *et al.*, 2020). A fiziológiai, viselkedési és környezeti adatok együttes elemzésével a gépi tanulás ígéretes lehetőséget kínál a tejelő tehenek hőkomfortjának és hőstresszének pontosabb nyomon követésére és előrejelzésére.

Shirley és munkatársai (2024) a hőstresszel szembeni alkalmazkodóképesség jellemzésére egységes terminológia alkalmazását javasolták. Meghatározásuk szerint az állat hőstressz-rezisztens (heat resistant), amennyiben a változó környezeti hőmérsékleti viszonyok ellenére is képes fiziológiai állapotát fenntartani; ez genetikailag meghatározott, veleszületett tulajdonság. Hőstressz-toleránsnak (heat tolerant) tekinthető, ha bizonyos mértékig képes megőrizni

hőmérsékleti egyensúlyát kedvezőtlen környezeti feltételek mellett. Ezzel szemben a reziliencia (resilience) az állat azon képességét jelenti, hogy a hőterhelés megszűnését követően gyorsan visszanyeri eredeti fiziológiai állapotát.

A hőstressz nem csupán a szervezet általános élettani működését befolyásolja, hanem jelentős hatást gyakorol a reprodukciós folyamatokra is. Ennek megfelelően a következőkben a hőstressz nőivarú szarvasmarhák reprodukciójára gyakorolt hatásai kerülnek bemutatásra.

3.2.2. A hőstressz hatása a nőivarú szarvasmarhák reprodukciójára

A hőstressz a tejelő szarvasmarhák esetében nemcsak az állatok fizikai jóllétére gyakorol kedvezőtlen hatást, hanem jelentősen csökkenti a termelést, rontja az egészségi állapotot, valamint a reprodukciós folyamatok hatékonyságát is kedvezőtlenül befolyásolja (Oliveira *et al.*, 2025). Számos tanulmány igazolta a THI emelkedése és a vemhesülési arány csökkenése közötti összefüggést. Nagy tejtermelésű állományokban a 70-es THI-érték felett a vemhesülési arány a THI egységnyi növekedésével átlagosan mintegy 4,6%-kal mérséklődhet, bár ennek mértéke az éghajlati viszonyoktól, a fajtától és az alkalmazott reprodukciós technológiától is függ (Krishnan *et al.*, 2017).

A magas környezeti hőmérséklet és páratartalom közvetlenül károsítja a reprodukzív szervek és szövetek sejtfunkcióit, többek között fokozza az oxidatív stresszt, mitokondriális diszfunkciót idéz elő, megzavarja az immunválaszt és a citoskeletális folyamatokat, valamint elősegíti az apoptózis kialakulását (Das *et al.*, 2016; Shaleh *et al.*, 2026).

A hőstressz többek között a hormonális szabályozás megzavarásán keresztül rontja a termékenységet és csökkenti a haszonállatok reprodukciós teljesítményét. A petefészek működését elsősorban a hipotalamusz-hipofízis-gonád tengely szabályozza, amelynek kulcsszereplői a hypothalamus által termelt gonadotropin-felszabadító hormon (GnRH), valamint az adenohypophysis gonadotrop hormonjai, a follikulusstimuláló hormon (FSH) és a luteinizáló hormon (LH). A hőstressz ezen hormonokra gyakorolt hatását illetően azonban a szakirodalomban eltérő eredmények találhatók (Wolfenson–Roth, 2018). A fokozott hőterhelés csökkenti az LH pulzatilis elválasztásának intenzitását és gyakoriságát, ami kedvezőtlenül befolyásolja a domináns tüszők érését (Wolfenson *et al.*, 2000), emellett zavarokat okoz az ösztadiol szintéziséért felelős granulosa sejtek működésében, ezáltal csökkenti az ösztadiol termelődését. Az alacsonyabb ösztadiol-koncentráció következtében az ivarzás viselkedési tünetei kevésbé kifejezettek, illetve megnő a csendes ivarzás előfordulásának gyakorisága (Miętkiewska *et al.*, 2022). Emellett a hőterhelés következtében mérséklődik az LH-csúcs intenzitása, valamint az LH bazális szintje, ami kedvezőtlenül befolyásolja az ovulációt és a funkcionális sárgatest kialakulását. Ennek

következtében csökken a progeszteron termelődése (Wolfenson *et al.*, 2018). A hőstressz hatására ugyanakkor fokozódik a follikulusstimuláló hormon (FSH) szekréciója, amelyet a plazma inhibinkoncentrációjának jelentős csökkenése idéz elő. Az emelkedett FSH-szint következtében a petefészekben nagyobb számú tüsző növekedése figyelhető meg (Roth *et al.*, 2000), melynek következtében megnőhet a kettős ovuláció gyakorisága, ami a nyári időszakban az ikerellések előfordulásának növekedéséhez vezethet (Wolfenson *et al.*, 2018). Továbbá a hőstressz fokozza az agyalapi mirigy adrenokortikotrop hormonjának (ACTH) elválasztását, amely serkenti a glükokortikoidok felszabadulását. A megnövekedett glükokortikoid-szint gátolja a petesejtek meiotikus érését (Al-Katanani *et al.*, 2002).

3.2.3. A hőstressz hatása a tüszőérésre

A korai tüszőfejlődés szempontjából jól ismert, hogy a nyugalmi állapotban lévő primordiális tüszők a petefészek kéregállományának gyengén erezett területein helyezkednek el, ezért növekedésük és fennmaradásuk nem függ közvetlenül az FSH és az LH hatásától (Longo *et al.*, 2025). Ez az anatómiai sajátosság hozzájárulhat ahhoz, hogy a primordiális tüszők ellenállóbbak a hőstressz káros hatásaival szemben, így kedvezőtlen környezeti feltételek mellett sem károsodnak jelentős mértékben. Torres-Júnior és munkatársai (2008) kimutatták, hogy a hőstressznek kitett tehenektől nyert petesejtek fejlődési képessége a hőstressz megszűnését követően még 105 nap elteltével is elmaradt a kontroll csoportban elhelyezett tehenektől származó petesejtekétől. Mivel a primordiális tüszőktől a preovulációs tüszőig tartó fejlődés körülbelül 120 napot vesz igénybe (Denicol *et al.*, 2023; Hernandez-Fonseca *et al.*, 2005), míg a primer tüszőktől az ovulációig tartó fejlődés mintegy 100 napig tart (Hansen, 2013), feltételezhető, hogy a primer tüszőstádiumtól kezdve a petesejtek érzékenyek a hőstressz káros hatásaira. A korai tüszők azonban természetes élettani környezetükből eltávolítva, majd *in vitro* tenyésztésnek alávetve lényegesen érzékenyebbek bizonyulnak a hőstresszre. Aguiar és munkatársai (2020) megállapították, hogy a tüszőfejlődés valamennyi stádiuma – a primordiális, a primer és a szekunder tüszők – érzékeny a hőstresszre, különösen a szekunder tüszők. A korai tüszők *in vivo* és *in vitro* körülmények között megfigyelhető eltérő hőstressz-érzékenysége feltehetően annak tulajdonítható, hogy *in vivo* a petefészek stromája, az extracelluláris mátrix, a stabil oxigénellátás és a parakrin szabályozás védő hatást fejtenek ki, ezáltal csökkentve az oxidatív károsodás mértékét (Ahmed *et al.*, 2020).

A korai antrális tüszők a tüszőfejlődés kritikus szakaszát reprezentálják. Ebben a stádiumban a petesejtek még nem érték el teljes érési és megtermékenyülési képességüket, ugyanakkor intenzív növekedés jellemzi őket, amely során szoros funkcionális kapcsolatot

tartanak fenn a kumulusz- és granulosa sejtekkel (Barbalho *et al.*, 2024). A tüszők további növekedéséhez, valamint a follikuláris fázisba való eljutásához elengedhetetlen a gonadotrop hormonokra adott megfelelő válaszreakció. Fejlett érhálózatuk és az FSH-, illetve LH-receptorok fokozott expressziója miatt azonban ezek a tüszők különösen érzékenyek a hőstressz káros hatásaira. A hőstressz kedvezőtlenül befolyásolja a petefészek vérellátását, valamint gátolja a granulosa sejtek működését, ami a tüszőfejlődés gátlásához vezethet (Kawano *et al.*, 2022; Miętkiewska *et al.*, 2022; Varnosfaderani *et al.*, 2020).

A 3 mm-nél nagyobb antrális tüszők fejlettebb érhálózattal rendelkeznek, ezért a korai antrális tüszőkhöz képest érzékenyebbek a stresszhatásokra (Cortvrindt–Smitz, 2001). Schüller és munkatársai (2017) üzemi körülmények között kimutatták, hogy a hőmérséklet-páratartalom index minden egységnyi emelkedése az ivarzás napjára a tüsző átmérőjének átlagosan 0,1 mm-es csökkenésével járt.

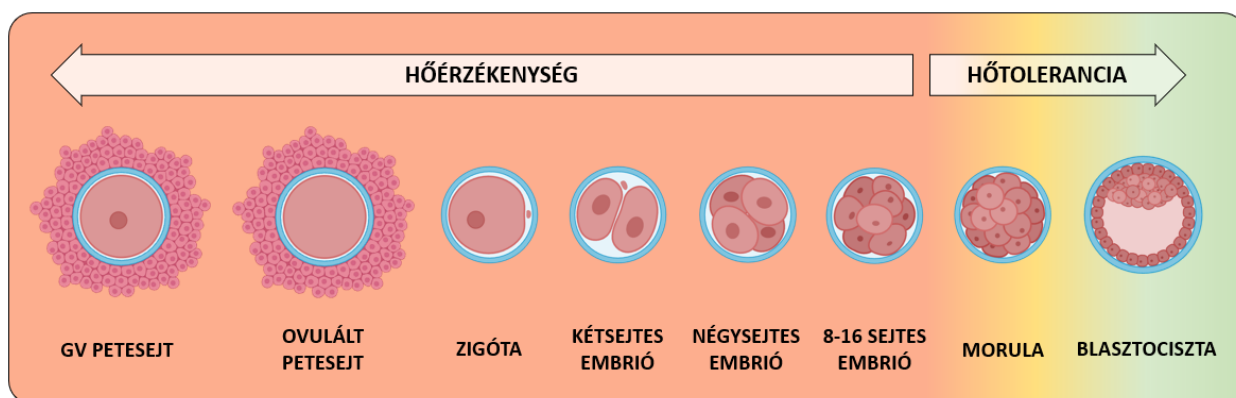
3.2.4. A petesejtek hőérzékenysége

Az *in vitro* technológiák szarvasmarha-tenyésztésben történő egyre szélesebb körű alkalmazása miatt kiemelt figyelmet érdemel a hőstressz petesejtekre gyakorolt hatása. A petesejt érése az embrió sikeres fejlődésének egyik alapvető feltétele. A petesejtek különösen érzékenyek az emelkedett hőmérsékletre a germinális vezikulum (GV) stádiumában, valamint az érési időszakban (Al-Katanani *et al.*, 2002; Roth, 2017). Az érési folyamat során számos tényező befolyásolja a petesejt minőségét, amely meghatározza a korai embrionális fejlődés támogatásához szükséges fejlődési potenciálját. Ezek közül a hőstressz az egyik legjelentősebb károsító tényező, amely közvetlenül rontja a petesejtek minőségét (Souza *et al.*, 2021; Feltes *et al.*, 2023). *In vivo* vizsgálatok kimutatták, hogy a tüszőfejlődés hosszú időtartama miatt a hőstressz káros hatásai elhúzódhatnak, és a petesejtek teljes regenerációjához gyakran több hét is szükséges lehet (Khan *et al.*, 2020). *In vitro* vizsgálatok kimutatták, hogy a hőstressz kedvezőtlenül befolyásolja a fehérjeszintézist, valamint rontja a petesejtek fejlődési képességét. A hőstressz csökkenti az érett petesejtek arányát azáltal, hogy gátolja a meiózis II. szakaszának folytatódását, ami közvetlenül rontja az embriófejlődés hatékonyságát (Danso *et al.*, 2024; Souza *et al.*, 2021), valamint a citoszkeletális mikrotubulusok, mikrofilamentumok és az osztódási orsó szerkezetének rendellenességeit okozhatja (Ju–Tseng, 2004). Emellett a hőstressz a petesejt citoplazmájának károsodását is előidézheti, ami a citoplazmatikus organellek – különösen a mitokondriumok – alakjának, működésének és elrendeződésének megváltozásához vezethet (Sammad *et al.*, 2020). A szarvasmarha petesejtek *in vitro*, magas hőmérsékletnek (41 °C) történő kitétele kedvezőtlenül befolyásolja azok fejlődési képességét és a későbbi embriófejlődést. Ennek hátterében a

mitokondriumok működésének zavara állhat, amely csökkenti az adenozin-trifoszfát (ATP) szintézisét, valamint megváltoztatja a sejtek redox-egyensúlyát a reaktív oxigénformák (ROS) szintjének emelkedésén keresztül (Wrzecińska *et al.*, 2023). A petesejtek károsodása továbbá összefüggésbe hozható a sejtmembrán tulajdonságainak megváltozásával, beleértve a zsírsav-összetétel és a membrán fizikai jellemzőinek módosulását, valamint a tüszőfolyadék összetételében bekövetkező változásokat, például az inzulinszerű növekedési faktor-1-hez (*IGF1*) kötődő fehérjék és a szteroid hormonok szintjének megváltozását (Roth, 2017; de Rensis *et al.*, 2017). A hőstressz a kumulusz-petesejt komplexek (COC) aminosav-anyagcseréjét is megváltoztatja. Ennek következtében fokozódik a fenilalanin, a valin, az alanin és a glutaminsav felszabadulása, miközben csökken a leucin, az izoleucin, a szerin és a glutamin mennyisége. Ezek a változások kedvezőtlenül befolyásolják a korai embrionális fejlődést, csökkentve az osztódási és a blasztociszta-arányt (Mzedawee *et al.*, 2024). Roth és munkatársai (2001) kimutatták, hogy a hőstressz megszűnését követően legalább két-három ivari ciklus szükséges a kompetens petesejtek újbóli megjelenéséhez. Bár a petesejt különösen érzékeny a hőstresszre, a fokozott hőterhelés a megtermékenyítést követően is kedvezőtlenül befolyásolja az embrió fejlődését és életképességét.

3.2.5. Az embriók hőérzékenysége

A szarvasmarha preimplantációs embriók hőstresszel szembeni érzékenysége jelentős mértékben függ azok fejlődési stádiumától (Hansen, 2007; Sakatani, 2017). A különböző fejlődési stádiumok hőstresszel szembeni érzékenységét a 2. ábra szemlélteti.



2. ábra. A petesejtek és embriók hőérzékenységének sematikus ábrázolása (Saját szerkesztésű ábra Sakatani (2017) Naranjo-Gómez *et al.* (2021) és Roth (2017) alapján)

Az első sejtosztódást követő korai fejlődési stádiumokban lévő embriók általában érzékenyebbek az emelkedett hőmérsékletre, míg a hőstresszel szembeni ellenálló képességük fokozatosan növekszik a blasztociszta stádium felé haladva (Naranjo-Gómez *et al.*, 2021; Roth, 2017). Diaz és munkatársai (2025) arról számoltak be, hogy a korai embriók *in vivo* és *in vitro*

fejlődés során egyaránt hasonló módon reagáltak a hőstresszre. A korai embriófejlődés során a citoplazmában számos változás megy végbe, többek között a citoszkeleton átrendeződése, a kromatin kondenzációja, a sejtszervecskék blastomerek középpontja felé történő vándorlása, valamint a mitokondriumok duzzanata, mely a későbbiekben sejtkárosodáshoz vezethet (Rivera *et al.*, 2003; Rivera *et al.*, 2004). Fear és Hansen (2011) megállapították, hogy a kétsejtes stádiumú embriók még nem képesek hőstressz által indukált apoptotikus választ kialakítani. Paula-Lopes és Hansen (2002) ugyanakkor arra is rámutattak, hogy a fejlettebb embriókban a hőstressz által kiváltott apoptózis nem kizárólag káros folyamat, hanem hozzájárulhat a károsodott sejtek eliminációjához, ezáltal elősegítve az embrió további fejlődését. A fejlődés harmadik napja körül az embrió eléri a 8–16 sejtes stádiumot, amikor bekövetkezik az embrionális genom aktivációja (embryonic genome activation, EGA). Ennek során a petesejtből származó anyai transzkriptumok fokozatosan lebomlanak, miközben megindul az embrió saját génjeinek átíródása, amely a további fejlődés szabályozásáért felelős (Carvalho *et al.*, 2024; Deluao *et al.*, 2022). Ezen folyamatnak köszönhetően a kompakt morulák fejlődési üteme hőstressz és termoneutrális körülmények között is hasonló marad (Shaleh *et al.*, 2026). Ezt alátámasztva Sakatani és munkatársai (2012) *in vitro* kísérletükben igazolták, hogy a 24 órán át tartó, 40 °C-on történő embriótenyésztés a morula és blasztociszta stádiumú embriók fejlődését alig vagy egyáltalán nem befolyásolja. Ezzel szemben a korai fejlődési stádiumú embriókat érő hőstressz hatásai túlmutathatnak a közvetlen stresszperióduson, és a későbbi fejlődést is kedvezőtlenül befolyásolhatják (Naranjo-Gómez *et al.*, 2021; Ouellet *et al.*, 2021). A magas hőmérséklet közvetlenül fokozza a reaktív oxigénformák (ROS) képződését, ami oxidatív stresszt idéz elő, és kedvezőtlenül befolyásolhatja a korai embriók biológiai folyamatait (Sakatani *et al.*, 2004). Amennyiben a ROS termelődése és a sejtek antioxidáns védekező kapacitása közötti egyensúly felborul, az embriók minősége romlik (Held-Hoelker *et al.*, 2025; Sakatani, 2017). Ezen túlmenően, még azoknál a korai stádiumú embrióknál is, amelyek túléltek a kezdeti hőstresszt, az emelkedett hőmérsékletnek való kitettség alacsonyabb összsejtszámmal járt. Ez a csökkenés különösen a blasztociszták trofektoderma sejteinek számában volt kifejezett (Sakatani *et al.*, 2012; Sakatani *et al.*, 2008).

A hőstressz emellett kedvezőtlen hatást gyakorolhat a blasztociszták beágyazódására és életképességére (Burkuš *et al.*, 2015), valamint a magzati fejlődésre is (Koch *et al.*, 2016). Ezenkívül a vemhesség alatti hőterhelés epigenetikai változásokat indukálhat az utódokban, amelyek hosszú távon a felnőtt egyed, sőt a későbbi generációk fenotípusát is befolyásolhatják (Huber *et al.*, 2020).

3.2.6. Molekuláris változások hőterhelés következtében

Sejtszinten a hőstressz felborítja a proteosztázist, a redox-egyensúlyt és a sejtciklus szabályozását, ezáltal számos olyan adaptív sejtválaszt vált ki, amelyek a sejtek integritásának fenntartását szolgálják (de Barros *et al.*, 2018; Miętkiewska *et al.*, 2022). A molekuláris chaperonok, közismert nevükön hősokkfehérjék (heat shock proteins, HSP-k), központi szerepet töltenek be a fehérjék hibás feltekeredésének és aggregációjának megelőzésében, ezáltal hozzájárulnak a sejtek védelméhez (Hu *et al.*, 2022). A HSP-fehérjecsalád számos típust foglal magában, többek között a HSP110, HSP100, HSP90, HSP70, HSP60, HSP40, HSP27 és HSP10 fehérjéket (Gupta *et al.*, 2024; Hariyono–Prihandini, 2022; Jianfang *et al.*, 2025). A hőstressz hatására az egyik elsőként indukálódó fehérje a HSP70. Emellett a HSP-k expressziója a stresszhatás mértékétől is függ. A HSP70 expressziója például rövid ideig tartó, a normál hőmérsékletet legalább 3 °C-kal meghaladó hőterhelés hatására jelentősen fokozódik (Naranjo-Gómez *et al.*, 2021). A HSPA14-et a hőstresszre adott válasz egyik legfontosabb, hő hatására indukálódó géneként azonosították, amely meghatározó szerepet játszik a termikus stressznek kitett embriók túlélésében (Hassan *et al.*, 2019). A HSP70 mellett a HSP90 az egyik legszélesebb körben vizsgált hősokkfehérje, amelynek fontos szerepet tulajdonítanak a hőstressz által kiváltott sejtválaszokban (Hu *et al.*, 2024). Emellett számos, a sejtek stresszválaszában szerepet játszó gén is aktiválódik, többek között a ciklooxigenáz-1 és -2 (COX1 és COX2), az X-kromoszómához kötött apoptózisgátló fehérjét kódoló XIAP, valamint a BCL-2 gén (Naranjo-Gómez *et al.*, 2021).

Bár a legtöbb vizsgálat a hősokkfehérjéket kódoló génekre irányult, mára egyértelművé vált, hogy a hőstressz számos olyan gén expresszióját is módosítja, amelyek nem közvetlenül a hősokkválaszban vesznek részt (Sonna *et al.*, 2002). Feng és munkatársai (2024) szerint a hőstressz jelentősen megváltoztatja a petesejtek fejlődési képességével, a citoszkeleton szerveződésével, a mitokondriumok működésével, valamint az epigenetikai szabályozással összefüggő gének expresszióját. A hősokkhatásnak kitett petesejtekből fejlődő blasztocisztákban szignifikánsan csökken a *DNS-metiltranszferáz-3-alfa (DNMT3A)* gén expressziója, amely a DNS-metiláció epigenetikai szabályozásában játszik kulcsszerepet. Mindezek alapján feltételezhető, hogy a vemhesség alatti hőstressz epigenetikai változásokat indukálhat a fejlődő embrió csírasejtjeiben, amelyek később fenotípusos eltérések kialakulásához vezethetnek az utódokban (Weller *et al.*, 2021). Megfigyelték továbbá a *glutation-peroxidáz 1-et (GPX1)* kódoló gén expressziójának csökkenését is, amely kulcsszerepet játszik a sejtek oxidatív stresszel szembeni védelmében (Brigelius-Flohé–Flohé, 2020). Stamperna és munkatársai (2021a) arról számoltak be, hogy a *Placenta-specific 8 (PLAC8)* gén expressziója mind a kontroll, mind a hőstressznek kitett, HSP70-kezelt embriókban fokozott volt. A *PLAC8* az embrió és az anya közötti kölcsönhatások, valamint

a placenta fejlődésének fontos szabályozója, ezért a szerzők a megnövekedett expressziót a fejlődési képesség és az embrióminőség javulásának lehetséges markerének tekintették. A *DNMT3A* és a *PLAC8* expressziós mintázata arra utal, hogy a hőstressz ugyan csökkenti a petesejtek túlélését, azonban a túlélő oociták továbbra is képesek lehetnek egészséges embriókká fejlődni (Stamperna *et al.*, 2020). Ezzel szemben de Barros és Paula-Lopes (2018) kimutatták, hogy a hőstressz a szarvasmarha embriók epigenetikai szabályozásának zavarához vezet az olyan, korai embrionális fejlődés szempontjából kulcsfontosságú imprintált gének, mint a *H19* és az *IGF2R* hipometilációja révén.

A mikroRNS-ek (miRNS-ek) kis méretű, nem kódoló RNS-molekulák, amelyek elsősorban a génexpresszió poszttranszkripciószabályozásában vesznek részt a cél-mRNS-ek degradációjának elősegítése vagy transzlációjuk gátlása révén (Pasquinelli, 2012). Capalbo és munkatársai (2016) feltételezték, hogy az embriók a mikroRNS-eket az extracelluláris térbe választják ki, ahol azok parakrin jelátviteli molekulaként vesznek részt az endometrium és az embrió közötti kommunikációban. Berkhout és munkatársai (2020) kimutatták, hogy a miR-320a az embriók által szekretált, potenciális preimplantációs biomarker, amelynek jelenléte elsősorban a magasabb morfológiai minőségű embriók tenyésztőműködésében volt jellemző. Ezzel ellentétben Rio és munkatársai (2024) eredményei arra utalnak, hogy a miR-320a potenciálisan gátolhatja a beágyazódást, mivel azt vizsgálatukban elsősorban a lassabban fejlődő embriók választották ki. Bár a miR-320a szerepével kapcsolatban a szakirodalomban nem alakult ki egységes álláspont, fontos megjegyezni, hogy a vizsgálatok eltérő fajokon és különböző tenyésztési körülmények között zajlottak. Feltételezhető továbbá, hogy a miR-320a a beágyazódás szabályozásában egyaránt kifejtethet stimuláló és gátló hatást, mivel a mikroRNS-ek a genomban számos különböző célgén expresszióját szabályozhatják (Rio *et al.*, 2024). Sengar és munkatársai (2018) 420 azonosított miRNS közül 65 esetben mutattak ki eltérő expressziót emelkedett hőmérsékleti körülmények között, ami arra utal, hogy a miRNS-ek jelentős szerepet tölthetnek be a sejtek hőstresszre adott válaszában. Hőstressz hatására a miR-191-5p expressziója fokozódott, míg a miR-378a-3p expressziója csökkenő tendenciát mutatott. A funkcionális elemzés alapján a kiválasztott miRNS-ek több célgénje is a stresszválaszban és az oxidatív stresszel összefüggő jelátviteli útvonalakban vesz részt. Továbbá a megváltozott expressziójú miRNS-ek és célgénjeik hálózatelemzése arra utalt, hogy a stressz a sejtes jelátviteli mechanizmusok befolyásolásán keresztül fejti ki hatását.

3.3. Az embriók termotoleranciájának növelési lehetőségei

A szarvasmarha embriók hőstresszre adott válaszát vizsgáló korábbi kutatások elsősorban a hőstresszre adott akut válaszreakciókra összpontosítottak, és az emelkedett hőmérsékletnek való kitettséget követően rendszerint a stresszválaszhoz kapcsolódó gének fokozott expresszióját, valamint az embriók továbbfejlődési képességének csökkenését írták le (Collier *et al.*, 2008; Sakatani *et al.*, 2012). Ezzel szemben az eredmények arra utalnak, hogy az érzékeny fejlődési szakaszokban bekövetkező mérsékelt hőterhelés nem kizárólag átmeneti stresszválaszt idéz elő, hanem a génexpresszió és a fejlődési folyamatok tartós megváltozásához is vezethet (de Barros–Paula-Lopes, 2018; Naranjo-Gómez *et al.*, 2021; Oliveira *et al.*, 2021). Ezek az eredmények eltérő elképzelésekhez vezettek a stresszválaszban szerepet játszó gének késői fejlődési stádiumokban megfigyelhető megváltozott expressziójának biológiai jelentőségét illetően. Egyes feltételezések szerint a tartós génaktiváció a sejtszintű stressz fennmaradását és a fejlődés károsodását tükrözi, míg mások szerint a megváltozott vagy csökkent génexpresszió adaptív szabályozási folyamatokra, illetve a fokozott stressztűrő képességű embriók szelektív túlélésére utalhat (Al-Jaryan *et al.*, 2023; Archana *et al.*, 2017; Naranjo-Gómez *et al.*, 2021). Feltételezések szerint a korai fejlődési szakaszban jelentkező, nem letális mértékű stresszhatás fejlődési plaszticitást vagy adaptív kondicionálódást idézhet elő, amely növelheti az embriók későbbi környezeti vagy kísérleti stresszhatásokkal szembeni ellenálló képességét (Rhoads *et al.*, 2020).

Al-Katanani és Hansen (2002) a kétsejtes szarvasmarha embriók enyhe hőkezelés hatására kialakuló indukált termotoleranciájának lehetőségét vizsgálták. Eredményeik szerint a mérsékelt előzetes hőkezelés nem csökkentette a későbbi, súlyosabb hősokk káros hatásait, ami arra utal, hogy ebben a fejlődési stádiumban az embriók még nem rendelkeznek adaptív hőstressz-válasz kialakításának képességével. A szerzők ugyanakkor kimutatták, hogy a HSP70-fehérje gátlása jelentősen rontotta a blasztociszta stádiumig történő fejlődést, amely alapján feltételezhető, hogy a HSP70 fontos szerepet játszik a korai embrió normális fejlődésében, még akkor is, ha önmagában nem elegendő a termotolerancia kialakulásához.

Oliveira és munkatársai (2021) egy kontrollált hőkezelési protokollt dolgoztak ki a szarvasmarha embriók termotoleranciájának fokozására. A késői morula stádiumban (144 hpi) alkalmazott hőkezelés növelte a HSPA (HSP70) fehérjék expresszióját, ugyanakkor nem befolyásolta kedvezőtlenül a blasztociszta-arányt, a sejtszámot vagy az apoptózis mértékét. A kezelt embriók egy későbbi hősokkot követően nagyobb túlélési arányt mutattak, míg recipiens állatokba történő átültetésük után sem a vemhesülési arányban, sem a magzati fejlődésben nem mutatkozott kedvezőtlen hatás. Az eredmények alapján az enyhe hőkezelés biztonságos módszer lehet az embriók hőtűrő képességének fokozására.

A hőstressz egyik legjelentősebb, a petesejtek és embriók minőségét alapvetően befolyásoló hatása a reaktív oxigénformák fokozott termelődése (Cavallari *et al.*, 2019; Nabenishi *et al.*, 2012), valamint a megfelelő fejlődésre képes tüszők számának csökkenése a petefészekben

(Roth–Hansen, 2004). A fokozott oxidatív stressz káros hatásai mérsékelhetők különböző antioxidáns vegyületek alkalmazásával, amelyek közül kedvező hatást igazoltak többek között a retinol (Lawrence *et al.*, 2004), a cisztein (Nabenishi *et al.*, 2012) és a melatonin (Cebrian-Serrano *et al.*, 2013) esetében. Feltételezések szerint az *inzulinszerű növekedési faktor-1 (IGF1)* hozzájárulhat a hőstressznek kitett embriók fejlődésének fenntartásához (Bonilla *et al.*, 2011; Stamperna *et al.*, 2021b). Kimutatták továbbá, hogy az embriók *in vitro* IGF1 kezelése növeli az embriótranszfert követő túlélési arányt hőstressznek kitett recipiens állatokban (Block–Hansen, 2007). A HSP70 fehérje alkalmazását is vizsgálták a hőstressz káros hatásainak ellensúlyozására. Stamperna és munkatársai (2021a) tanulmányukban kimutatták, hogy IVM során a médiumhoz adagolt exogén HSP70 mérsékli a hőstressz petesejtekre gyakorolt kedvezőtlen hatásait. A HSP70 alkalmazása javította a blasztocisztává fejlődött embriók arányát, valamint kedvezően befolyásolta a sejtvédelemmel, az antioxidáns védelemmel és az apoptózis szabályozásával összefüggő gének expresszióját, ezáltal hozzájárulva az előállított embriók minőségének javításához.

3.4. A petesejtek és embriók minőségét befolyásoló további tényezők

A hőstressz mellett számos egyéb anyai, környezeti és technológiai tényező is jelentős hatást gyakorol a petesejtek és a preimplantációs embriók minőségére. A petesejtek minősége és az *in vitro* embriófejlődés eredményessége fajtától és alfajtól függően eltérő lehet (Abraham *et al.*, 2010). Például az IVEP eredményessége rendszerint magasabb *Bos indicus* eredetű petesejtek felhasználásával, mint a *Bos taurus* húshasznú és tejelő fajtáiból származó petesejtek esetében (Pontes *et al.*, 2010; Watanabe *et al.*, 2017). Ez a kedvezőbb eredmény elsősorban a *Bos indicus* egyedek reprodukciós sajátosságaival, például nagyobb antrális tüszőtartalékkal magyarázható (Batista *et al.*, 2014). Thundathil és munkatársai (2022) vizsgálata szerint, bár a fajtatiszta Angus és Hereford tehenek OPU-IVEP eredményei különböztek egymástól, a programok eredményessége összességében magasabb volt tehenekben, mint keresztezett üszőkben. Ez feltehetően az állatok eltérő genetikai hátterének tulajdonítható, amely befolyásolja az embrió-előállítás eredményességét. Több tanulmány vizsgálta a donor életkorának hatását a kinyerhető petesejtek számára és azok megtermékenyítést követő, *in vitro* blasztocisztává fejlődésére (Du *et al.*, 2024; Landry *et al.*, 2016). A fiatalabb állatok petefészkében nagyobb számú antrális tüsző található, ezért a kinyerhető petesejtek száma is általában magasabb. Ennek ellenére a borjakból és üszökből származó petesejtek gyengébb minősége miatt az embrió-előállítás eredményessége és a vemhesülési arány is elmarad a tehenekből kinyert petesejtek esetében tapasztalt értékektől (Crowe *et al.*, 2021; Khatir *et al.*, 1996). Az ellés és az azt követő időszak a szarvasmarha szaporodásbiológiájának kritikus szakaszai, amelyeket az ellés, a méh involúciója és a laktáció megindulása jellemez. Az ezekkel párhuzamosan zajló metabolikus és hormonális változások, az

immunrendszer átmeneti szuppressziója, valamint a gyulladásos folyamatok fokozott kockázata kedvezőtlenül befolyásolhatja a reprodukciós folyamatokat (Pascottini *et al.*, 2020; Serbetci *et al.*, 2024). A laktáló tejelő tehenek petesejtjeinek minősége és megtermékenyülési aránya rendszerint elmarad a nem laktáló tehenekétől. Ez elsősorban a laktációval járó metabolikus terhelésnek tulajdonítható, amely kedvezőtlenül befolyásolja a korai embriófejlődést, valamint fokozza a metabolikus és fertőző megbetegedések kockázatát az ellést követő időszakban (Leroy *et al.*, 2012; Ribeiro *et al.*, 2016). A nagy tejtermelés emellett fokozza a szteroidhormonok metabolizmusát, ami a progeszteron- és ösztradiolszint csökkenéséhez, valamint az ivarzási tünetek kevésbé kifejezett megjelenéséhez vezet (López *et al.*, 2005). Az ilyen hormonális egyensúlyzavarok kedvezőtlenül befolyásolhatja a follikuláris dinamikát, amelynek következtében nagyobb tüszők alakulhatnak ki a petefészekben. Ez a petesejtek minőségének romlásával, valamint az OPU során kinyerhető életképes petesejtek számának csökkenésével jár, ezáltal kedvezőtlenül hat a későbbi embriófejlődésre (Missio *et al.*, 2022; Wiltbank *et al.*, 2006).

A petesejt minősége mellett a termékenyítéshez felhasznált spermiumok tulajdonságai is jelentős hatást gyakorolnak az embrió fejlődésére. A spermiumok megtermékenyítő képessége, valamint az egészséges blasztociszta fejlődésének támogatása számos kulcsfontosságú tényezőtől függ. Ezek közé tartozik a spermiumok normál morfológiája, az akroszóma-reakcióra való képesség, a spermium és a petesejt közötti hatékony kölcsönhatás, a zona pellucidán történő sikeres áthatolás, a spermium sejtmagjának megfelelő dekondenzációja, valamint a DNS épsége. E folyamatok bármelyikének zavara csökkentheti a termékenyítőképességet, és kedvezőtlenül befolyásolhatja az embrió fejlődését (Sosa–Ortega, 2025).

Számos tanulmány igazolta a takarmányozás és a reprodukció közötti komplex kapcsolatot, miszerint a takarmányfelvétel mennyisége, a takarmány összetétele, a takarmányozás intenzitása, valamint a kondíciópontszám jelentős hatást gyakorol a termékenységre, elsősorban a petefészek működésének befolyásolásán keresztül (Ponter *et al.*, 2012; Velazquez *et al.*, 2023). Dantas és munkatársai (2019) kimutatták, hogy a komplex formában adagolt nyomelemek (például a cink, réz és mangán) kedvezően befolyásolják az OPU-IVEP eredményességét. A tápanyaghiány, valamint a negatív energiamérleg kedvezőtlenül befolyásolja a petesejtek fejlődését, ugyanakkor a túlzott takarmányozás is csökkentheti az embrió-előállítás hatékonyságát (Reynolds–Vonnahme, 2017; Velazquez *et al.*, 2023).

Az embriók előállításának módja alapvetően meghatározza a fejlődő embriók minőségét. Az *in vitro* embrió-előállítás alacsonyabb eredményessége részben a szuboptimális tenyésztési körülményeknek tulajdonítható, amelyek kedvezőtlenül befolyásolhatja a petesejtek és az embriók anyagcseréjét (Marsico *et al.*, 2019). A petesejtek *in vitro* érése során biztosított körülmények jelentősen eltérnek az *in vivo* érés fiziológiás környezetétől (Dunning–Robker,

2017). A petesejtérés körülményeinek módosítása jelentősen befolyásolhatja a petesejtek fejlődését, amely elsősorban a blasztociszta-előállítás eredményességében nyilvánul meg. A petesejtek és a korai embriók különösen érzékenyek a különböző exogén tényezők – így a hőmérséklet, az ozmolaritás, az oxigénkoncentráció, a pH, az aminosavak és a lipidek – változásaira. Számos tanulmány vizsgálta a petevezető és a méh oxigénkoncentrációját különböző emlősfajokban. Eredményeik szerint a petevezető oxigénkoncentrációja rendszerint 5–8% közötti, míg a méhben ennél is alacsonyabb oxigénszint jellemző (Sciorio–Smith, 2019; Steptoe *et al.*, 1971). A vizsgálatok eredményei alapján az alacsony oxigénkoncentráció alapvető jelentőségű az embriók megfelelő fejlődéséhez, mivel a magasabb oxigénszint elősegíti a reaktív oxigénformák képződését, amelyek oxidatív sejtkárosodást idézhetnek elő (Konstantogianni *et al.*, 2024). A tenyésztőmédiüm összetétele az *in vitro* embrió-előállítás egyik legfontosabb tényezője, mivel annak fizikai és kémiai tulajdonságai közvetlen hatást gyakorolnak az embriók minőségére. Számos vizsgálat igazolta, hogy különböző antioxidáns hatású vegyületek – például aminosavak (cisztein, ciszteamin) és nyomelemek (szelén, cink) – tenyésztőközeghez történő hozzáadása a petesejtek érése vagy az embriók tenyésztése során kedvezően befolyásolja azok fejlődését (Dos Santos Mendonça-Soares *et al.*, 2022; Elgebaly *et al.*, 2022; Sovernigo *et al.*, 2017; Wooldridge *et al.*, 2019). Kimutatták továbbá, hogy több antioxidáns együttes alkalmazása IVM során növeli a blasztociszta stádiumig fejlődő embriók arányát, ami arra utalhat, hogy az antioxidánsok kombinációja additív módon mérsékelheti az oxidatív stressz káros hatásait (Sovernigo *et al.*, 2017).

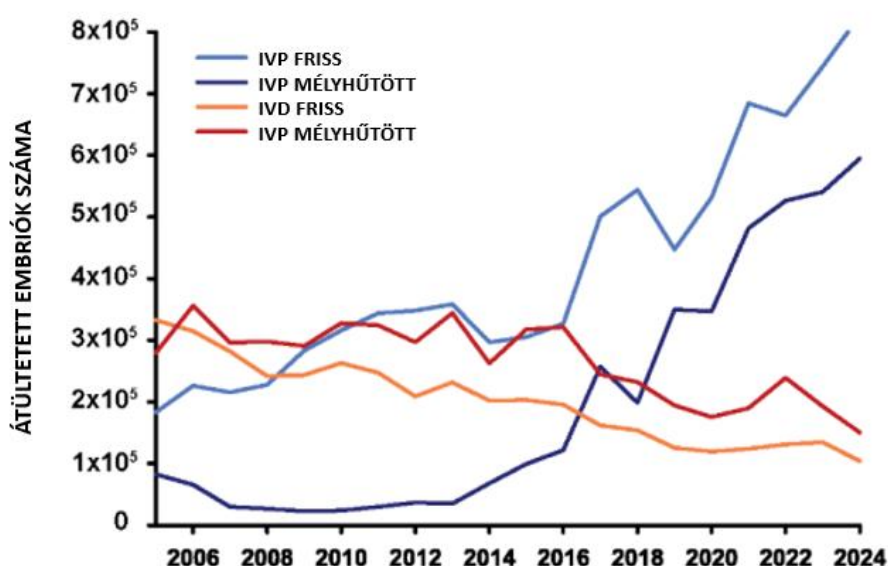
Mindezek alapján a tenyésztési körülmények optimalizálása alapvető jelentőségű, mivel azok nemcsak az embriók fejlődését, hanem krioprezervációval szembeni ellenálló képességét és felolvasztás utáni életképességét is meghatározzák.

3.5. Krioprezerváció

Az embriók krioprezervációja olyan, cseppfolyós nitrogénben (LN) történő megőrzési eljárás, amely lehetővé teszi az embriók hosszú távú tárolását életképességük megőrzése mellett. A szarvasmarha embriók krioprezervációjára jelenleg két fő módszert alkalmaznak: a programozott lassú fagyasztást és a vitrifikációt. A lassú fagyasztás hosszú ideje a szarvasmarha embriók mélyhűtésének standard módszere, különösen az *in vivo* előállított embriók esetében. A módszerrel a friss embriók átültetéséhez hasonló vemhesülési arányok érhetők el. A vitrifikáció ezzel szemben kedvezőbb módszernek tekinthető az *in vitro* előállított (IVP) embriók esetében, mivel ezek az embriók fokozottan érzékenyek az alacsony hőmérséklet által okozott károsodásokra (Sudano *et al.*, 2016). A csökkent kriotolerancia elsősorban a sejtekben

felhalmozódó lipideknek, különösen a triglicerideket tartalmazó lipidcseppeknek tulajdonítható (Abe *et al.*, 2002; McKeegan–Sturmeý, 2011; Sudano *et al.*, 2011). Ezen túlmenően az *in vitro* előállított embriók csökkent fagyaszthatóságával olyan ultrastrukturális és biokémiai jellemzők is összefüggésbe hozhatók, mint a sejtkapcsoló struktúrák csökkent száma, a mitokondriumok és mikrobolyhok alacsonyabb mennyisége, a perivitellinális tér megnövekedése, valamint a fokozott sejttörmelék-képződés (Abe *et al.*, 2002; Fair *et al.*, 2001; Rizos *et al.*, 2002). Mindazonáltal a vitrifikált embriók felolvasztási folyamata technikailag összetettebb és időigényesebb, ami korlátozza a módszer rutinszerű alkalmazását (Sudano *et al.*, 2016). Ugyanakkor a lassú fagyasztás az *in vitro* előállított embriók esetében is megfelelő alternatívát jelenthet. Sanches és munkatársai (2016) arról számoltak be, hogy a lassú fagyasztással (34,7%), illetve vitrifikációval (31,2%) fagyasztott IVP embriók átültetését követően a vemhesülési arány a 60. vemhességi napon nem különbözött számottevően. Arshad és munkatársai (2021) 78 vizsgálatot és összesen 12 211 *in vitro* előállított *Bos taurus* embrió magában foglaló szisztematikus áttekintésben és metaanalízisben értékelték azok krioprezervációt követő túlélését. Eredményeik szerint felolvasztást követően az embriók reexpansiós aránya 24 óra elteltével 66%, míg 72 óra múlva 36% volt. A kikelési arány 24 óránál 15%-ról 72 órára 25%-ra emelkedett, míg a blasztociszták túlélési aránya 24 órával a felolvasztást követően 60%, 72 óra elteltével pedig 57% volt.

Az *in vitro* előállított krioprezervált embriók átültetésének aránya világszerte folyamatosan növekszik (3. ábra) (Viana, 2025) annak ellenére, hogy ezen embriók átültetését követően a vemhesülési arány továbbra is alacsonyabb, mint a friss embriók esetében (Hansen, 2020b).



3. ábra. Az átültetett *in vivo* és *in vitro* előállított, friss és krioprezervált embriók megoszlásának alakulása világszerte 2005 és 2024 között. (Viana, 2025)

Az asszisztált reprodukciós technológiák alkalmazása során a krioprezerváció jelentős kihívást jelent, mivel a folyamat során fellépő hőmérsékleti, ozmotikus és oxidatív stressz negatívan befolyásolhatja a blasztociszták felolvasztás utáni túlélését és molekuláris folyamatait (Ofosu *et al.*, 2023). Stinshoff és munkatársai (2011) RT-qPCR vizsgálattal kimutatták, hogy hagyományos lassú fagyasztást követően a *HSPA1A*, *SLC2A1*, *TJP1*, *SLC2A3*, *DNMT3A* és *IFNT2* gének expressziója szignifikánsan eltért a kontrollcsoportban megfigyelt értékektől.

Az embriók kriotoleranciája számos tényezőtől függően eltérő lehet, amelyet többek között a faj, az embrió fejlődési stádiuma, valamint annak eredete (*in vivo* vagy *in vitro*) egyaránt befolyásol (Dalcin–Lucci, 2010; Leme *et al.*, 2020; Marsico *et al.*, 2019). Emellett Marsico és munkatársai (2020) transzkriptomikai elemzéssel kimutatták, hogy a nagyobb kriotoleranciával rendelkező, felolvasztást követően reexpansióra és kikelésre képes embriókban fokozott volt a sejtnövekedéssel, a sejtproliferációval és a sejtek túlélésével összefüggő gének expressziója. Ezzel szemben az alacsonyabb kriotoleranciájú embriókban elsősorban a gyulladásos folyamatokkal és a sejthalállal kapcsolatos gének esetében dokumentáltak magasabb expressziót. Az *in vitro* előállított embriók kriotoleranciájának fokozására számos lehetőséget dolgoztak ki, beleértve az alacsony oxigénkoncentráció melletti tenyésztést az oxidatív stressz csökkentése érdekében, valamint antioxidánsok és apoptózisgátló vegyületek alkalmazását (Lin *et al.*, 2018; Pero *et al.*, 2018). Az intracelluláris lipidfelhalmozódás mérséklését célzó anyagok alkalmazását szintén vizsgálták a kriotolerancia javításának lehetséges módszereként, bár a lipidtartalom csökkenése nem minden esetben járt együtt a kriotolerancia javulásával (Dias *et al.*, 2020).

3.6. A reprodukciós mutatók javítási lehetőségei hőstresszes időszakban embriótranszfer alkalmazásával

Az embriótranszfer (ET) a hőstressz okozta reprodukciós veszteségek mérséklésének egyik legígéretesebb biotechnológiai eszköze. Az embriók átültetésével áthidalható a hőstresszre legérzékenyebb korai embrionális fejlődési szakasz, valamint az ivarzást követő hetedik napon végzett ET kiküszöböli a hőstressz ovulációra gyakorolt kedvezőtlen hatásait is, mivel embriókat kizárólag olyan recipiensekbe ültetnek be, amelyekben funkcionális sárgatest alakult ki. Ezáltal javíthatók a vemhesülési eredmények a magas környezeti hőmérséklettel jellemezhető időszakokban (Baruselli *et al.*, 2020). Egy nagylétszámú brazil Holstein-fríz állomány retrospektív elemzése alapján az embriótranszfer egész évben magasabb vemhesülési arányt eredményezett, mint a mesterséges termékenyítés, különösen a melegebb hónapokban (Rodrigues *et al.*, 2007). További vizsgálatok szintén megerősítették, hogy hőstresszes időszakban az embriótranszfer hatékonyabban javítja a vemhesülési eredményeket, mint a mesterséges termékenyítés (Baruselli

et al., 2011; Demetrio *et al.*, 2007; Stewart *et al.*, 2011). Bár a vemhességvesztés a hőstresszes időszakban, valamint embriótranszfert követően magasabb volt, a 60. vemhességi napra számított vemhesülési arány továbbra is kedvezőbbnek bizonyult az embriótranszferbe vont állatokban (Baruselli *et al.*, 2011; Freitas *et al.*, 2010). Annak ellenére, hogy hőstresszes időszakban csökken a donor állatok embriótermelése, Vieira és munkatársai (2014) szerint az embrió előállításának időpontja önmagában nem befolyásolja jelentősen az embriótranszfert követő vemhességi eredményeket. Ez arra utalhat, hogy azok az embriók, amelyek sikeresen átvészelik a hőstresszre legérzékenyebb korai fejlődési szakaszt, a későbbiekben a hűvösebb időszakban előállított embriókhoz hasonló vemhességi arányt képesek fenntartani. Ugyanakkor továbbra sem tisztázott, hogy a hőstressz hatására kialakuló korai génexpressziós változások hosszú távon befolyásolják-e az utódok egészségét és teljesítményét.

Az esetleges későbbi káros hatások kiküszöbölésére lehetséges alternatívát jelent az embriók hűvösebb évszakokban történő előállítása és krioprezervációja, majd azok felhasználása a nyári hőstresszes időszakban (Baruselli *et al.*, 2020). Mori és munkatársai (2015) hagyományos lassú fagyasztással mélyhűtött, majd felolvasztott IVP blasztociszták hőstresszre adott válaszát vizsgálták. Eredményeik szerint a felolvasztást követő hősokk jelentősen csökkentette az embriók reexpansziós képességét és az embriók átmérőjét. Emellett fokozódott a *HSPA1A* expressziója, míg az *IFNT* expressziója csökkent, ami arra utal, hogy a krioprezerváció és a hőstressz együttesen ronthatja az embriók életképességét. Ezen megállapításokkal összhangban áll Sakatani (2017) vizsgálata is, amely szerint a mélyhűtés csökkentheti a blasztociszták természetes termotoleranciáját, így a felolvasztott embriók hőstressz hatására alacsonyabb túlélést és kedvezőtlenebb génexpressziós mintázatot mutatnak, ami hozzájárulhat a nyári időszakban végzett fagyasztott embriótranszferek alacsonyabb vemhesülési eredményeihez. A mélyhűtött embriók hőstresszel szembeni fokozott érzékenysége különösen jelentős gyakorlati kihívást jelent, mivel a nyári hőstressz mérséklésére irányuló IVEP embriótranszfer (IVEP-ET) programok hosszú távú sikeressége nagymértékben a fagyasztott embriók alkalmazhatóságától függ. Baruselli és munkatársai (2020) kiemelték, hogy a hőstressz hatásainak mérséklését célzó ET programok széles körű alkalmazásának egyik legfontosabb feltétele a krioprezervációs eljárások fejlesztése, mivel a stratégia hatékonyságát alapvetően az embriók fagyaszthatósága és felolvasztás utáni túlélése határozza meg.

A krioprezervációs technológiák fejlesztése mellett az embriótranszfer eredményességének javítása érdekében számos alternatív reprodukciós stratégia is vizsgálat tárgyát képezi. Amennyiben a körülmények lehetővé teszik, a friss, nem mélyhűtött embriók átültetése hatékony lehetőséget jelent a hőstressznek kitett tejelő tehenek vemhesülési eredményeinek javítására a nyári időszakban (Negrón-Pérez *et al.*, 2019). A friss embriótranszfer hatékonysága hőstresszes

időszakban többféle stratégiával is fokozható. Az egyik ígéretes megközelítés a hőstresszre kevésbé érzékeny donorállatok – például üszők és nem laktáló tehenek – alkalmazása, amelyek jobb petesejtminőséggel és kedvezőbb embriótermelési eredményekkel jellemezhetők (Vieira *et al.*, 2014). További megoldást jelenthet a fokozott termotoleranciával rendelkező állatok szelekciója, beleértve a természetes módon hőtűrő fajtákat, valamint a kedvező genetikai háttérrel rendelkező egyedeket. Kiemelt jelentőségű a SLICK mutáció, amely rövidebb szőrzettel és fokozott verejtékezéssel jár, ezáltal javítja a hőtűrő képességet, és génszerkesztési eljárásokkal más fajtákba is bevezethető (Dikmen *et al.*, 2014; Loi *et al.*, 2016). Emellett az ivarzásmegfigyelést nem igénylő időzített embriótranszfer (Timed Embryo Transfer, TET) protokollok alkalmazása egyszerűsíti a reprodukciós menedzsmentet és növeli az embriótranszfer programok hatékonyságát hőstresszes körülmények között (Baruselli *et al.*, 2010; Rodrigues *et al.*, 2010). A termotoleranciával összefüggő gének, például a *HSPA1L*, valamint a hőtűréssel kapcsolatba hozható genetikai markerek azonosítása és szelekciós programokban történő alkalmazása a jövőben hozzájárulhat a hőstresszel szemben ellenállóbb állományok kialakításához, ezáltal mérsékelve a hőstressz okozta reprodukciós veszteségeket (Basiricò *et al.*, 2011; Carabaño *et al.*, 2019; Cheruiyot *et al.*, 2021; Sigdel *et al.*, 2019).

3.7. Prolongált embriótenyésztés

Az emlősök korai embriófejlődését a morula stádiumig mitotikus sejtosztódások sorozata jellemzi. A morula kialakulásakor a sejtek polarizációja megindítja az embrionális sejtek differenciálódását, amelynek eredményeként elkülönül a külső és belső sejtréteg. A külső sejtrétegből fejlődik ki a trofektoderma, míg a belső sejtréteg a belső sejtömeget (inner cell mass, ICM) alkotja (Jiang, 2025). Ezen sejtpopulációk molekuláris jellemzésére alkalmazott transzkripciós faktorok közé tartozik a CDX2 és az OCT4. A CDX2 a trofektoderma fejlődésében és fenntartásában szerepet játszó faktor, amely a blasztociszta stádiumban elsősorban a trofektoderma sejtek magjában mutatható ki (Berg *et al.*, 2011; Madeja *et al.*, 2013). Az OCT4 a pluripotencia szabályozásához kapcsolódó transzkripciós faktor, amely korai szarvasmarha-blasztocisztákban a belső sejtömeg mellett a trofektodermában is jelen lehet (Madeja *et al.*, 2013). A két faktor expressziójának szabályozása fajfüggő, ezért az egérben leírt kölcsönös gátlásuk szarvasmarhában nem tekinthető a sejtvonalak elkülönülését magyarázó általános mechanizmusnak (Berg *et al.*, 2011; Shi *et al.*, 2023). A CDX2 és az OCT4 térbeli eloszlásának vizsgálata így a fejlődési stádium és a fajspecifikus sajátosságok figyelembevételével járulhat hozzá a sejtvonalak differenciálódási állapotának jellemzéséhez. A differenciálódással párhuzamosan kialakulnak azok a funkcionális tulajdonságok, amelyek lehetővé teszik a blasztociszta üregének (blastocoel) kialakulását, ezáltal létrehozva a blasztocisztára jellemző szerkezeti felépítést. A blastocoel üregének fokozatos tágulása és a zona pellucida elvékonyodása

együttesen teszi lehetővé a blasztocisza kikelését (hatching) (Carreiro *et al.*, 2022; Sawai, 2021). A kikelést követő fejlődési szakaszt a belső sejttömeg differenciálódása jellemzi, amelynek során kialakul az epiblaszt és a hipoblaszt. A későbbi gasztruláció során az epiblasztból alakul ki a három csíralemez – az ektoderma, a mezoderma és az endoderma –, amelyek az embrionális szövetek és szervrendszerek kialakulásának alapját képezik (Pérez-Gómez *et al.*, 2021). A fejlődés ezen, molekuláris és sejtszintű mechanizmusában még nem teljes körűen feltárt szakaszában a vemhességi veszteségek előfordulása különösen magas. Tejhasznú szarvasmarhákban az *in vivo* fejlődő embriók esetében a vemhességi veszteség előfordulása különböző vizsgálatok szerint 7–32% közé tehető (Berg *et al.*, 2022; Crowe *et al.*, 2025; Diskin–Morris, 2008; Diskin *et al.*, 2006). *In vitro* előállított embriók esetében az embrionális fejlődés zavara nagyobb arányban van jelen, mivel az embriók 23–65%-ában nem alakul ki embriódiszk, így ezek az embriók nem képesek a további fejlődésre, ami végül a vemhesség elvesztéséhez vezet (Desmet *et al.*, 2020; Ealy *et al.*, 2019; Loureiro *et al.*, 2011; Pérez-Gómez *et al.*, 2021). Ez a jelenség feltehetően az *in vitro* embrió-előállítási rendszerek korlátaival hozható összefüggésbe. A fejlődési rendellenesség hosszú időn át rejtve maradt, mivel a blasztocisza kikelését követő megnyúlási szakaszt vizsgáló tanulmányok elsősorban az embrió hosszát tekintették az embrióminőség meghatározó mutatójának, miközben az embriódiszk kialakulását nem értékelték (Barnwell *et al.*, 2016; Kasimanickam *et al.*, 2021; O’Hara *et al.*, 2014). Emellett a haszonállatok korai vemhességének kimutatása a trofektoderma által termelt jeleken alapul, mint például a tejben vagy vérben kimutatható vemhességhez kapcsolódó glikoproteinek (pregnancy-associated glycoproteins, PAGs) (Filho *et al.*, 2020; Roberts *et al.*, 2015), illetve a perifériás granulocitákban kimutatható interferon által indukált gének expressziója (Kizaki *et al.*, 2013). Mivel ezek a jelek a trofektodermából származnak, olyan embriók esetében is megjelenhetnek, amelyekben nem alakult ki az embriódiszk. Ez a jelenség a vemhesség később felismerhető szakaszában bekövetkező vemhességvesztéshez vezet, amely meghosszabbítja a két ellés közötti időszakot, ezáltal jelentős gazdasági kárt okoz (Martínez de Los Reyes *et al.*, 2026).

Jelenleg korlátozottan állnak rendelkezésre olyan tenyésztőrendszerek, amelyek megbízhatóan képesek modellezni a blasztocisza kikelését követő embriófejlődést, ugyanis a hagyományos rendszerekben a kikelt blasztociszták a tenyésztőedény felszínéhez tapadnak, vagy összeesnek (Pérez-Gómez *et al.*, 2021). A hiányosság kiküszöbölése érdekében az elmúlt években több kutatócsoport is olyan tenyésztőrendszerek kidolgozására törekedett, amelyek támogatják az embriók kikelést követő, hosszan fenntartható *in vitro* fejlődését (Akizawa *et al.*, 2021; Machado *et al.*, 2012; Ramos-Ibeas *et al.*, 2023). Az első ilyen rendszerek agaróz alagutakat alkalmaztak, amelyekben 8 és 9 napos embriókat magas glükóztartalmú, szérummal kiegészített PHD (post-hatching development) médiumban tenyésztettek. Ezek a rendszerek lehetővé tették a trofektoderma és a hipoblaszt proliferációját, valamint az embriók megnyúlását, azonban az embriódiszk kialakulását nem sikerült elérniük (Vajta *et al.*, 2004; Brandão *et al.*, 2004; Machado

et al., 2012). Alternatív megközelítésként agarózrétegen vagy hagyományos tenyésztőedényben végzett post-hatching kultúrákat is alkalmaztak. Alexopoulos és munkatársai (2005) 5% FCS-sel kiegészített SOF médiumban 15 napon át tartó tenyésztést valósítottak meg, azonban az embriók többsége a tenyésztőedény felszínéhez tapadt vagy degenerálódott. A későbbi kutatások a tenyésztőmédium optimalizálására összpontosítottak. Brinkhof és munkatársai (2017) az embrionális őssejtek fenntartására kifejlesztett 5iLA médiumot alkalmazták, amely a tenyésztés 23. napjáig biztosította az embriók növekedését, azonban embriódiszk kialakulása nem valósult meg. Hasonló eredményeket értek el Hosoe és munkatársai (2019) KnockOut-DMEM alapú rendszerben, míg Akizawa és munkatársai (2021) RPMI/KSR alapú tenyésztőközeg alkalmazásával ugyan javították a hipoblaszt fejlődését, de az epiblaszt sejtek száma a tenyésztés 10. napja után fokozatosan csökkent. Jelentős előrelépést jelentett a Ramos-Ibeas és munkatársai (2020) által kidolgozott N2B27-alapú tenyésztési rendszer, amely elsőként tette lehetővé a hipoblaszt teljes migrációját, az epiblaszt sejtek fennmaradását és az embriódiszkhoz hasonló struktúrák kialakulását *in vitro*. A tenyésztési rendszert ezt követően tovább optimalizálták, ami jelentősen javította az embriók hosszú távú tenyésztésének eredményességét. A továbbfejlesztett, teljes mértékben *in vitro* rendszer új lehetőséget biztosít a sejtdifferenciálódás mechanizmusainak funkcionális vizsgálatára, valamint a korai vemhességveszteségek hátterében álló folyamatok feltárására, állatkísérletek alkalmazása nélkül (Ramos-Ibeas *et al.*, 2023).

A prolongált *in vitro* tenyésztés új lehetőséget biztosít a krioprezerváció embrionális fejlődésre gyakorolt hosszabb távú hatásainak elemzésére. Felolvasztást követően az embriók életképességének értékelése a legtöbb vizsgálatban a felolvasztást követő 24–48 órás, ritkábban 72 órás tenyésztési periódusra korlátozódik, amelynek során a túlélést elsősorban a reexpanszió és a kikelési arány alapján határozzák meg. Ezzel szemben a krioprezervált embriók zona pellucidából történő kikelését követő, hosszabb távú *in vitro* fejlődéséről továbbra is csak korlátozott ismeretek állnak rendelkezésre.

4. ANYAG ÉS MÓDSZER

4.1. *In vitro* embrió-előállítás

Az *in vitro* embrió-előállítást az IVF Limited T/A IVF Bioscience (Cornwall, Egyesült Királyság) protokollja szerint hajtottuk végre, kisebb módosításokkal. Az IVEP során az IVF Limited T/A IVF Bioscience szarvasmarhák számára előállított kereskedelmi forgalomban lévő médiumokat használtuk, melyek a következők voltak: OPU, WASH, OIL, BO-HEPES-IVM, BO-IVM, BO-IVF, BO-SEMENPREP és BO-IVC. A folyamat minden lépését 38,8 °C-ra felmelegített médiumokkal és fűtött tárgyasztalon végeztük.

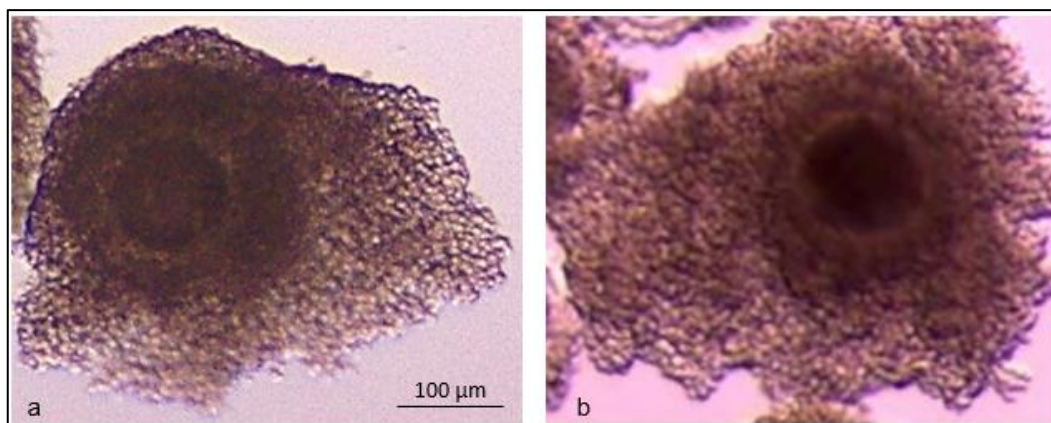
4.1.1. Petefészkek gyűjtése

Az *in vitro* embrió-előállításhoz szükséges petefészkeket a gyöngyösi Tendon Kft. szarvasmarha-vágóhídjáról gyűjtöttem, ahol a beszállított szarvasmarhák túlnyomó része Holstein-fríz fajtájú volt. A vágósoron a donorállatok fajtájának azonosítását követően kizárólag Holstein-fríz egyedek petefészkeit metszettem ki a nemi traktusból a vágást követő 5 percen belül, majd azokat a további laboratóriumi feldolgozás és tüszőaspiráció céljából szobahőmérsékletű foszfátpufferelt sóoldatot (PBS, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) tartalmazó, légmentesen záródó zacskókba gyűjtöttem. A teljes vizsgálat során összesen 1067 petefészket gyűjtöttem és dolgoztunk fel. A vágóhídon már elvégeztem az előzetes szelekciót, kizárólag aspirációra alkalmas petefészkeket metszettem ki. Az „A” kísérletben 296, a „B” kísérletben 265, a „C” kísérletben 239, a „D” kísérletben pedig 267 petefészket dolgoztunk fel. A petefészkek szállítása a vágóhídról a laboratóriumba körülbelül 50 percet vett igénybe. A szállítás alatt a zacskókat polisztirol dobozba helyeztem annak érdekében, hogy elkerüljem a hőingadozást. Az aspirációt megelőzően a felesleges szöveteket sebészi ollóval távolítottam el a petefészkekről, majd feldolgozásig előmelegített PBS-oldatban tároltam azokat.

4.1.2. Petesejtek aspirációja és *in vitro* maturációja (IVM)

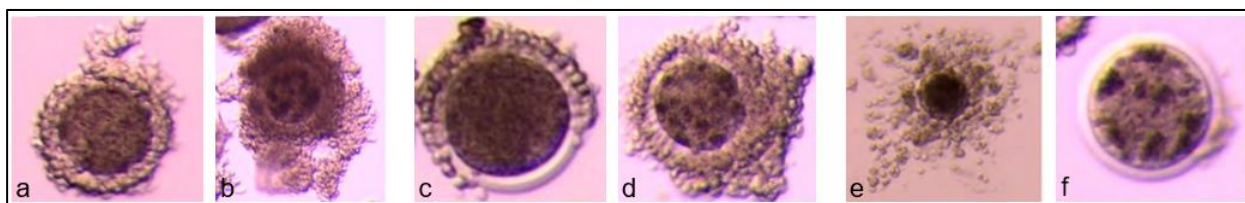
A petesejtek aspirációját az alaposan megtisztított petefészkekből 18 G injekciós tű és háromrészes, 5 mL űrtartalmú fecskendő segítségével végeztük. A 2–15 mm átmérőjű tüszőkből leszívott tüszőfolyadékot petesejt felvevő médium (OPU) + 10% magzati szarvasmarha szérum (FBS) (Capricorn Scientific, Ebsdorfergrund, Németország) oldatot tartalmazó, 15 mL űrtartalmú centrifugacsövekbe gyűjtöttük. A petesejteket a gyűjtőcső aljáról Pasteur-pipetta segítségével óvatosan egy 9 cm átmérőjű, 5–6 mL OPU + 10% FBS oldatot tartalmazó Petri-csészébe juttattuk. Az edény tartalmát sztereomikroszkóp alatt vizsgáltuk, majd kiválasztottuk a Nemzetközi

Embriótechnológiai Társaság (International Embryo Technology Society, IETS) által meghatározott I. minőségi osztályba tartozó kumulusz-petesejt komplexeket (COC), amelyekben a zona pellucida felszínét több mint három teljes, kompakt kumuluszsejtréteg borította, az ooplazma pedig sűrű, egyenletes szemcsézettségű volt (4. ábra).



4. ábra. (a) A kísérlet során érlelésre kiválasztott I. osztályú petesejt (Saját fotó) (b) Az IETS kézikönyvében meghatározott morfológiai kritériumok alapján I. osztályba sorolt petesejt (Demetrio–Barfield, 2021)

A kumulusz-petesejt komplexek további minőségi osztályokba sorolása az 5. ábrán bemutatott morfológiai jellemzők alapján történt. A II. minőségi osztályba sorolt kumulusz-petesejt komplexek esetében a zona pellucida felszínét egy vagy két kompakt kumuluszsejtréteg borítja, a petesejt citoplazmája pedig sűrű, egyenletes szemcsézettségű (5a. ábra) Az I. osztályú petesejteket a citoplazmában megfigyelhető apró foltok esetén a II. minőségi osztályba sorolják vissza (5b. ábra). A III. minőségi osztályba sorolt kumulusz-petesejt komplexek esetében a zona pellucida felszínét borító kumuluszsejtek nem alkotnak teljes sejtréteget (5c. ábra). A II. osztályú petesejteket a citoplazmában megfigyelhető apró foltok esetén a III. minőségi osztályba sorolják vissza (5d. ábra). A IV. minőségi osztályba sorolt kumulusz-petesejt komplexek (COC) kumuluszsejtrétegei expandáltak, gyakran agglutinált megjelenésűek (5e. ábra). A III. osztályú petesejteket a citoplazmában megfigyelhető apró foltok esetén a IV. minőségi osztályba sorolják vissza (5f. ábra).

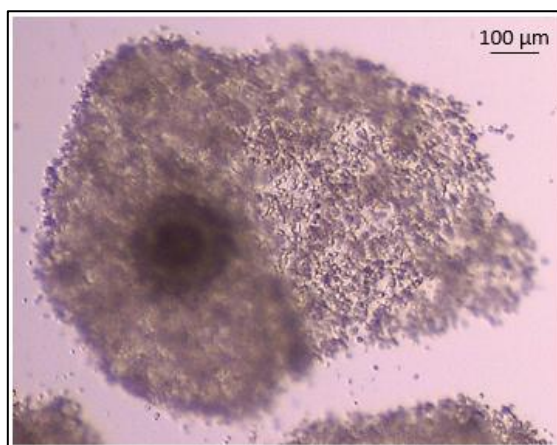


5. ábra. Az IETS kézikönyvében meghatározott morfológiai kritériumok alapján II. (a, b), III. (c, d) és IV. (e, f) minőségi osztályba sorolt petesejtek (Demetrio–Barfield, 2021)

A kiválasztott petesejteket 2–3 mL WASH médiumot tartalmazó 35 mm átmérőjű Petri-csészékben mostuk át több lépésben. A mosási folyamatot követően az „A” és „B” kísérlet során a kumulusz-petesejt komplexeket (COC-ket) 1 mL BO-HEPES-IVM médiumot tartalmazó kriogén csövekbe helyeztük, melyeket légmentesen lezártunk és 21–24 óra időtartamra CO₂ inkubátorba helyeztünk annak érdekében, hogy a petesejtek érése végbemenjen. Egy csőbe legfeljebb 40 petesejtet helyeztünk el. A „C” és „D” kísérletben az *in vitro* érlelés során a petesejteket ekvilibrált, olajfedés nélküli, 600 µL BO-IVM médiumot tartalmazó négylyukú tenyésztőedényben érleltük párasított atmoszférikus gázkörülmények között (5,5–6,5% CO₂-t és 21% O₂), egy cseppbe legfeljebb 40 petesejtet helyezve. Az olajfedés nélküli érlelést az IVF Bioscience IVEP rendszeréhez kidolgozott gyártói protokoll szakmai ajánlásával összhangban alkalmaztuk, mivel az olaj hosszabb ekvibráció során felveheti a médium lipofil hormonjait, ezáltal módosítva azok koncentrációját. A munkafolyamat során alkalmazott párasított inkubációs környezet egyben a párolgás mérséklését is szolgálta. A felhasznált BO-IVM médium fenolvörös pH-indikátort tartalmaz, ezért a pH-érték esetleges eltolódása az indikátor színváltozása alapján szemrevételezéssel nyomon követhető. A médium pH-értékét és ozmolaritását műszeres módszerrel nem határoztuk meg, ezért a párolgásból eredő esetleges ozmolaritásváltozás kizárására, valamint a pH esetleges változásának kvantitatív jellemzésére közvetlen mérési adatok nem álltak rendelkezésünkre. Az eltérő IVM-rendszerek és érlelőedények használatát az egyes kísérletek kivitelezésekor rendelkezésre álló laboratóriumi infrastruktúra indokolta. A különböző IVM-rendszereket és érlelőedényeket nem vizsgáltuk önálló kísérleti tényezőként.

4.1.3. *In vitro* fertilizáció (IVF)

A termékenyítés tervezett időpontja előtt két órával négylyukú tenyésztőedényeket (NUNC®, Thermo Fisher Scientific Inc., Rochester, USA) készítettem elő, melyekbe vájatonként 500 µL BO-IVF médiumot helyeztem ásványi olajjal lefedve. Az edényeket ezt követően 6% CO₂ és 16% O₂ gázkeveréket tartalmazó CO₂ inkubátorba helyeztem ekvibráció céljából. A petesejtek érését az érlelési idő lejártával sztereomikroszkóp alatt ellenőriztem. Az érés egyértelmű jele a petesejtet körülvevő kumuluszréteg fellazulása, melyet a 6. ábra szemléltet.



6. ábra. *In vitro* érlelt kumulusz-petesejt komplex (Saját fotó)

Az érett petesejteket óvatosan, kumuluszrétegük megsértése nélkül 1000 μ L-es automata pipettával eltávolítottam a csövekből, majd BO-IVF médiumban történő átmosásukat követően a termékenyítőcseppbe pipettáztam. A termékenyítéshez cseppenként legfeljebb 40 petesejtet helyeztem el. A sperma előkészítésének idejére a petesejteket tartalmazó tenyésztőedényt visszahelyeztem az inkubátorba.

Az *in vitro* termékenyítéshez felhasznált sperma a petefészek-donorokkal azonos fajtájú, Holstein-fríz tenyészbikától származott. A termékenyítést a Reform nevű, 33589 központi lajstromszámú egyed 2021. január 5-én gyűjtött spermájával végeztem. Az apai eredetű variabilitás minimalizálása érdekében valamennyi kísérlethez ugyanazon bikától származó spermát használtam. A termékenyítőanyagot tartalmazó, 0,25 mL űrtartalmú műszalmákat felolvasztás céljából cseppfolyós nitrogénből 37,8 °C-os vízfürdőbe helyeztem 20 másodpercre, majd 4 mL BO-SEMENPREP médiumot tartalmazó 15 mL-es centrifugacsőbe ürítettem. A csövet 38,8 °C-os fűtött asztali centrifugában (Eppendorf 5702 RH, Eppendorf AG, Hamburg, Németország) 5 percig 1700 fordulat/perc sebességgel centrifugáltam. A centrifugálás után a felülúszót óvatosan eltávolítottam, 400 μ L szuszpenziót hagyva a csőben. A mosási lépést 2 mL BO-SEMENPREP médiummal ismételtam, majd a felülúszó eltávolítása után a szuszpenziót mikroszkópos vizsgálatnak vettem alá. A spermaminták motilitását Makler-kamrában (Sefi Medical Instruments Ltd., Haifa, Izrael), Olympus BX43 típusú binokuláris mikroszkóppal (Olympus Corporation, Tokyo, Japán), szubjektív becsléssel értékeltük. A vizsgálathoz 5 μ L spermamintát helyeztünk a kamrára. Az *in vitro* fertilizációhoz legalább 40%-os motilitású spermamintákat fogadtunk el; a felhasznált minták motilitása általában 40–50% között alakult. A spermiumkoncentráció meghatározásához 10 μ L spermamintához 90 μ L desztillált vizet adtunk a minta hígítása és a spermiumok immobilizálása céljából. A szuszpenzió homogenizálását követően 5 μ L-t helyeztünk a megtisztított kamrára, majd elvégeztük a spermiumok számlálását. A termékenyítőcseppekhez adandó spermaminta mennyiségét a meghatározott

spermiumkoncentráció alapján számítottuk ki, majd a mért motilitás figyelembevételével korrigáltuk. A petesejteket tartalmazó termékenyítőcseppekben a végső spermiumkoncentrációt $2,0 \times 10^6$ spermium/mL értékre állítottuk be. A termékenyítés a petesejtek és a spermaminta 16–19 órán keresztül együtt tenyésztésével, ún. koinkubálásával történt 6% CO₂ és 16% O₂ gázkeverékben IVFTech hatkamrás inkubátorban (IVFTech, Klintehøj, Birkerød, Dánia).

4.1.4. *In vitro* embriótenyésztés (IVC)

A kísérletsorozat során összesen 4509 zigótát vontunk *in vitro* tenyésztésbe. Az embriók tenyésztéséhez négylyukú tenyésztőedényeket készítettem elő, melyekbe 500 µL BO-IVC médiumot helyeztem és ásványi olajjal fedtem le. Az edényeket ezután egy éjszakára IVFTech hatkamrás inkubátorban tartottam 5,5–6,5% CO₂ és 5,5–6,5% O₂ gázkeverékben ekvibráció céljából.

A kumuluszsejtek eltávolításához – denudáláshoz – vortex kezelést alkalmaztunk. A petesejtek és a spermaminta koinkubációját követően a zigótákat 100 µL-es pipettával eltávolítottuk a BO-IVF médiumból és steril, 1,5 mL űrtartalmú Eppendorf-csövekbe helyeztük, melyekbe előzőleg 500 µL WASH médiumot mértünk ki. Az egyes csoportok embrióit külön csőben denudáltuk. A csöveket vortex keverőn (ZX3 Advanced Vortex Mixer, Velp Scientifica srl, Usmate, Olaszország) 2750 rpm fordulatszámon 1,5 percig tartottuk annak érdekében, hogy a kumuluszsejteket a zigótákról eltávolítsuk. Ezután a cső tartalmát 35 mm-es, 2 mL WASH médiumot tartalmazó Petri-csészébe pipettáztuk, majd a csöveket többször átöblítettük. A kumuluszrétegtől megtisztított, denudált zigótákat 2 mL WASH médiumban még kétszer átmostuk. Ezután az előzőleg ekvibrált BO-IVC médiumban is átmostuk a preembriókat, majd a négylyukú tenyésztőedény megfelelő cseppjébe helyeztük őket, cseppenként maximum 40 darabot. Az embriók tenyésztése 38,8 °C-on, 5,5–6,5% CO₂ és 5,5–6,5% O₂ gázkeverékben hét napon keresztül IVFTech hatkamrás inkubátorban történt.

4.2. Hőkezelési kísérletek

A termékenyítést követő 116. órában (hpi) a korai morula stádiumú embriókat kiválasztottam, majd a kísérletek típusának függvényében egyenlő nagyságú csoportokra osztottam. Valamennyi kísérletben 50 µL térfogatú médiumcseppekben, cseppenként öt embriótenyésztettem.

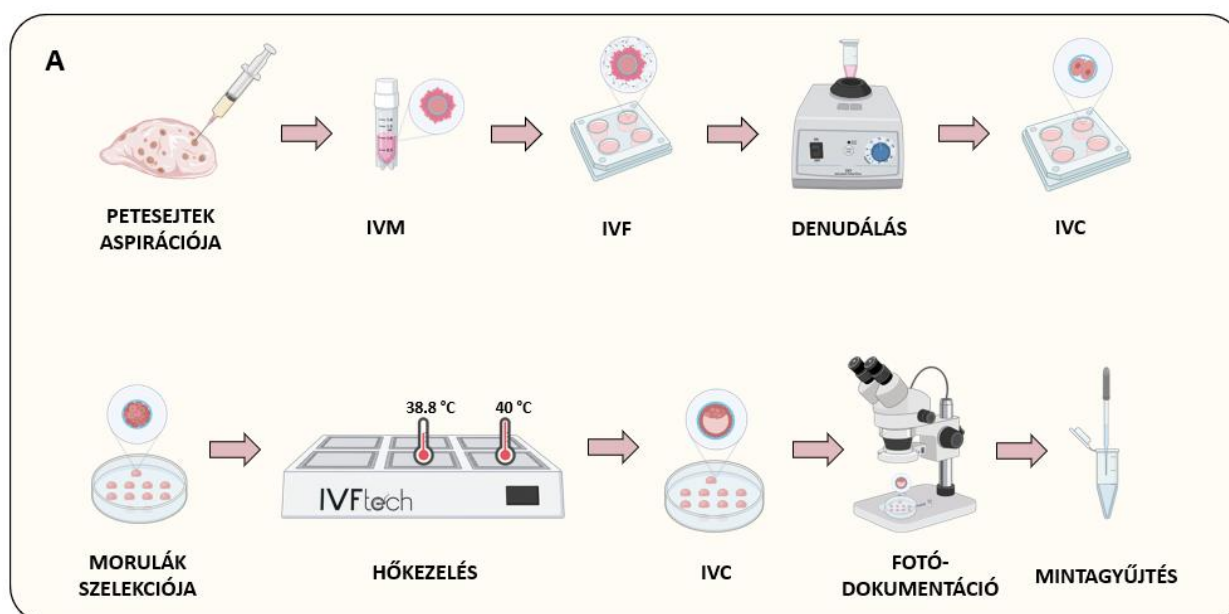
4.2.1. „A” kísérlet – Friss embriók vizsgálata

A kísérlet során öt korai morula stádiumú embriót helyeztem minden BO-IVC médiumcseppbe, amelyeket 35 mm-es Petri-csészékben ásványi olajjal fedtem le és az embriók behelyezése előtt két órán át ekvibráltam az embriótenyésztés során alkalmazott körülmények között. A kísérlet során az inkubátor két kamráját használtam: az 1. kamrában a kontrollcsoport (K) tenyésztése folyt, míg a hőkezelést (HK) és a hőstressz-kezelést (HS) a 2. kamrában végeztem. A vizsgálat teljes időtartama alatt következetesen ugyanazt a két inkubátorkamrát használtam, és az egyes kezelési csoportokat ugyanahhoz a kamrához rendeltem. Az azonos hőmérsékleti feltételek biztosítása érdekében mindkét inkubátorkamra hőmérsékletét minden kísérleti ismételéssel előtt kalibráltuk és ellenőriztük. Mivel az inkubátor valamennyi kamráját egyetlen, közös gázkeverő rendszer látja el egyidejűleg, a kísérlet teljes időtartama alatt azonos gázösszetételt biztosítottunk, így a gázösszetétel kamraspecifikus eltérései kizárhatók voltak. Emellett a kamrák ajtajának nyitási gyakorisága, valamint nyitva tartásuk időtartama valamennyi kezelési csoport esetében azonos volt. Fontos megjegyezni továbbá, hogy az inkubátor nem rendelkezik párasító rendszerrel, így a párasításból eredő kamraspecifikus eltérés nem állhatott fenn. A kontrollcsoportban a fent leírt tenyésztési feltételeket alkalmaztam. A hőkezelt csoport embrióit tartalmazó kamra hőmérsékletét 7 percenként 0,1 °C-kal emeltem 38,8 °C-ról 40,0 °C-ra. A célhőmérséklet elérésekor a hősokkcsoporthoz tartozó embriókat is a hőkezelési kamrába helyeztem, majd mindkét csoport embrióit két órán át 40,0 °C-on inkubáltam. A kétórás inkubációt követően a hősokkcsoporthoz tartozó embriókat visszahelyeztem a 38,8 °C-os standard tenyésztési hőmérsékletet biztosító kamrába, míg a hőkezelt csoportot tartalmazó kamra hőmérsékletét fokozatosan visszaállítottam a kiindulási, 38,8 °C-os értékre. A kísérletet három független biológiai ismételésben végeztem el. Az „A” kísérlet során összesen 1133 zigótát vontunk tenyésztésbe; az átlagos osztódási arány 56% volt. Az ezekből fejlődött embriók közül 270 korai morula stádiumú embriót vontunk be a további vizsgálatokba. Az embriókat egyenlő arányban osztottuk el a kontroll, hőkezelt és hősokknak kitett csoportok között (csoportonként $n = 90$), három ismételésben. A kísérletbe bevont embriók számát az 1. táblázatban foglaltam össze. A génexpressziós vizsgálathoz gyűjtött embriók számát úgy határoztuk meg, hogy lehetőség szerint minden mintában azonos számú, életképes blasztociszta szerepeljen. Az első biológiai ismételésben a hősokkcsoporthoz összesen 7 életképes embriót tudtam gyűjteni, a kontroll- és a hőkezelt csoportból 10–10 embriót gyűjtöttem, hogy az elemszám elegendő legyen. A másik két ismételésben a mintánkénti embriószám megválasztásakor a vizsgálatokhoz megfelelő mennyiségű RNS kinyeréséhez szükséges embriószám meghatározására is törekedtünk.

1. táblázat. Az „A” kísérletbe bevont embriók száma

Ismétlés	Kísérleti csoport	Vizsgált embriók száma	Génexpressziós analízisre gyűjtött embriók száma
A1	K	20	10
	HK	20	10
	HS	20	7
A2	K	40	20
	HK	40	20
	HS	40	20
A3	K	30	12
	HK	30	12
	HS	30	12

Az „A” kísérlet munkafolyamatait a 7. ábra szemlélteti.

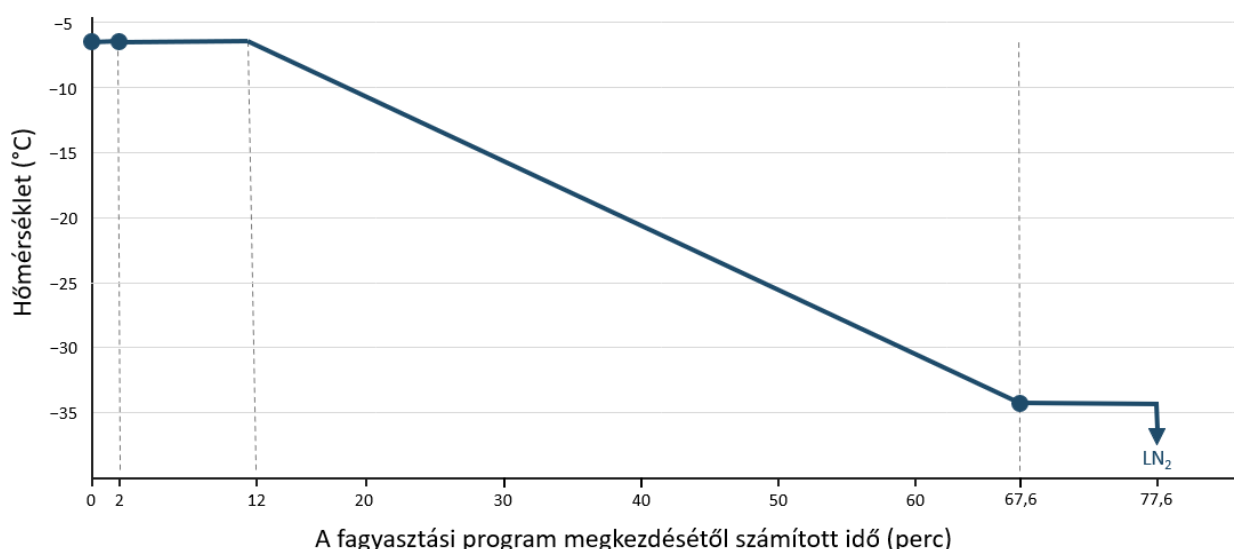


7. ábra. Az „A” kísérlet munkafolyamatainak sematikus ábrázolása

4.2.2. „B” kísérlet – Krioprezervált embriók vizsgálata

A kísérlet során az embriókat az „A” kísérletben alkalmazott protokoll szerinti hőkezelésnek vettem alá. A hősokk-kezelést a további kísérletekben nem alkalmaztam, mivel az „A” kísérletben a hősokknak kitett embriók génexpressziós válasza rendkívül nagy egyedi variabilitást mutatott, ami a csoport eredményeinek értelmezhetőségét korlátozta. A további kísérletek célja a kontrollált hőkezelés, mint potenciálisan alkalmazható eljárás jellemzése volt, ezért a pozitív stresszkontrollként szolgáló hősokk-csoportot a továbbiakban nem vizsgáltam tovább. Emellett a hősokkcsoporthoz bevonása jelentősen megnövelte volna a szükséges morulák számát, és a rendelkezésre álló embrió mennyiség nem tette volna lehetővé a három csoport megfelelő elemszámú vizsgálatát. A blasztociszta stádium elérését követően az embriókat lassú

fagyasztást alkalmazva krioprezervációnak vetettem alá, melynek során a Minitube GmbH (Tiefenbach, Németország) kereskedelmi forgalomban elérhető médiumait használtam. A fagyasztás első lépéseként a blasztocisztákat BoviHold médiumban többször mostam át, majd nyolc percig etilén-glikolt tartalmazó BoviFreeze médiumba helyeztem. Az embriókat ezután műszalmatöltő pipettor segítségével műszalmákba töltöttem a krioprotektáns oldattal együtt, és – 6,5 °C-ra előhűtött EFT-3002 embriófagyasztó (Beltron Instruments, Longmont, USA) kamrájába helyeztem. Két perc elteltével a jégmagképződést (seeding) cseppfolyós nitrogénben lehűtött rézrúddal indukáltam. Tíz perc elteltével elindítottam a fagyasztó készüléket; ezt követően a kamra hőmérséklete 0,5 °C/30 másodperc sebességgel –34,3 °C-ra csökkent. Amikor a hőmérséklet elérte a kívánt értéket, az embriókat tíz percen át a kamrában tartottam, majd gyors mozdulattal cseppfolyós nitrogénbe helyeztem. A 8. ábra a kísérletek során alkalmazott lassú fagyasztási folyamat fagyasztási görbáját szemlélteti.



8. ábra. A kísérletekben alkalmazott lassúfagyasztási folyamatot jellemző fagyasztási görbe (Saját szerkesztésű ábra a Beltron Instruments gyártói ajánlásai alapján)

Az embriókat felolvasztásig cseppfolyós nitrogénben, –196 °C-on tároltam. A felolvasztás során az embriókat tartalmazó műszalmákat 30 másodpercig 37,8 °C-ra melegített vízfürdőbe helyeztem, majd azok tartalmát 35 mm átmérőjű Petri-csészékbe ürítettem. Az embriókat több lépcsőben, BoviHold médiumban mostuk át annak érdekében, hogy a krioprotektáns anyagot eltávolítsuk. A blasztocisztákat ezután olajfedéssel ellátott BO-IVC médiumot tartalmazó tenyésztőedénybe helyeztem. A túlélési arányt a felolvasztást követő 24. órában, sztereomikroszkóppal határoztam meg (Marsico *et al.*, 2019). A „B” kísérlet során összesen 846 zigótát tenyésztettünk; az átlagos osztódási arány 48% volt. A mélyhűtési vizsgálatokba összesen 64 blasztocisztát vontunk be, amelyek közül 29 a kontroll-, 35 pedig a hőkezelt csoportba tartozott.

2. táblázat. A „B” kísérletbe bevont embriók száma

Ismétlés	Kísérleti csoport	Mélyhűtött embriók száma	Génexpressziós analízisre gyűjtött embriók száma*
B1	K	7	7
	HK	9	7
B2	K	11	8
	HK	10	6
B3	K	11	8
	HK	16	15

* Az analízisre gyűjtött embriók száma megegyezik a felolvasztást követően életképes embriók számával.

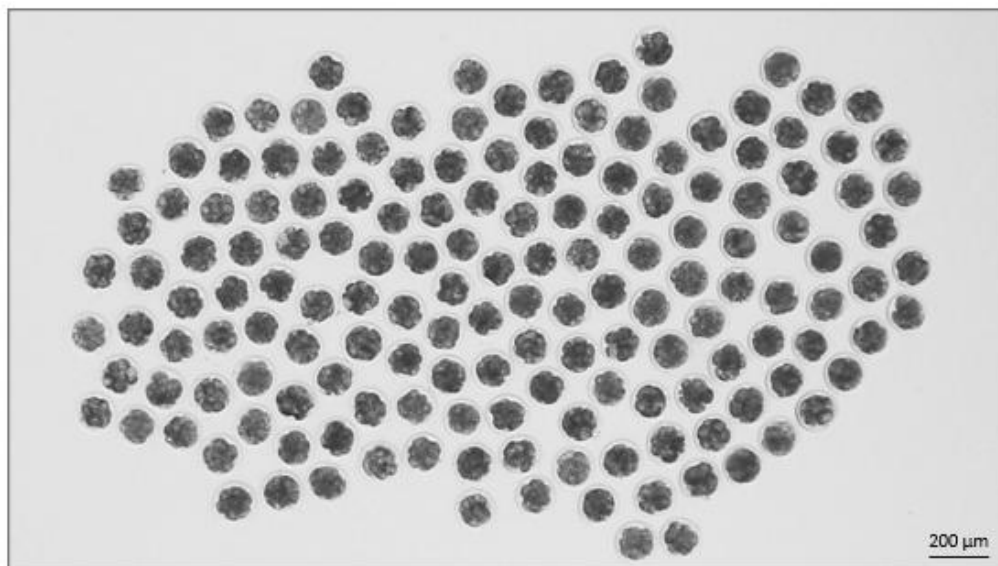
A „B” kísérlet munkafolyamatait a 9. ábra szemlélteti.



9. ábra. A „B” kísérlet munkafolyamatainak sematikus ábrázolása

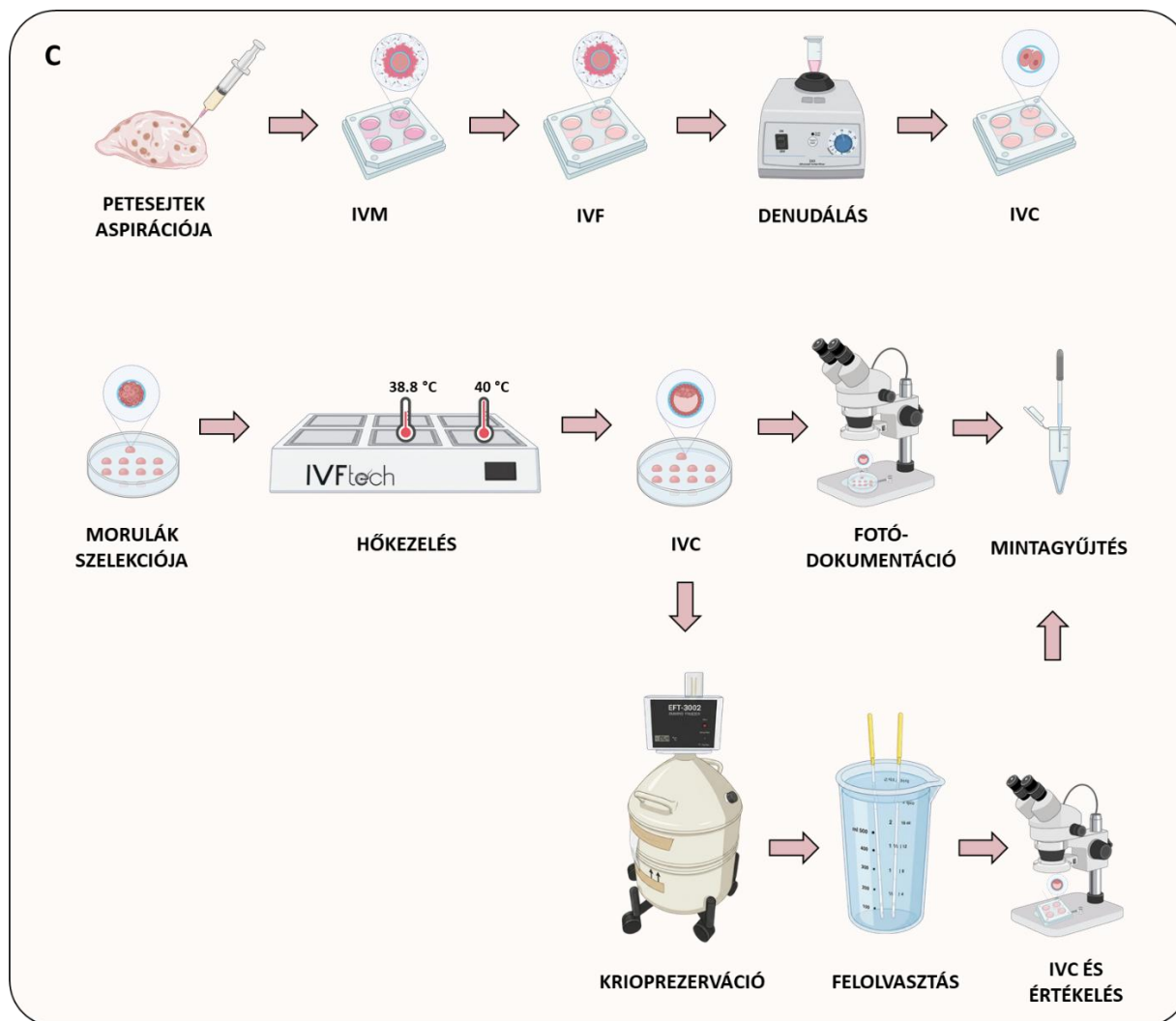
4.2.3. „C” kísérlet – Friss és krioprezervált embriók vizsgálata

A „C” kísérletet az „A” és „B” kísérlet kísérleti elrendezésének egyesítésével valósítottam meg, megnövelt elemszámmal, a korábbi eredmények megerősítése céljából. Három független biológiai ismétlésben összesen 1187 zigótát használtunk fel, amelyek átlagos osztódási aránya 81,6% volt. Ismétlésenként $n = 160$, összesen 480 korai morula stádiumú embriót választottam ki, amelyeket egyenlő arányban osztottam el a kontroll- (K) és a hőkezelt (HK) csoportba (csoportonként és biológiai ismétlésenként $n = 80$). A „C3” biológiai ismétlésben felhasznált morula stádiumú embriók a 10. ábrán láthatók.



10. ábra. A „C3” biológiai ismétlésbe bevont morula stádiumú embriók

A hőkezelést a termékenyítést követő 116. órában, az „A” kísérletben leírt protokoll szerint végeztem. Az „A” és „B” kísérlettől eltérően a fejlődési kompetenciát két időpontban értékeltem: a blasztociszta-arányt a tenyésztés 7. (D7) és 8. (D8) napján egyaránt meghatároztam. Génexpressziós analízisre mindkét időpontban csoportonként $n = 15$ blasztocisztát gyűjtöttem, poolozott mintaként. A 7. napon blasztociszta stádiumot elért embriók egy részét lassú fagyasztással krioprezerváltam a „B” kísérletben leírt protokoll szerint; a felolvasztást követő 24. órában a túlélő embriókból csoportonként ugyancsak $n = 15$ blasztocisztát gyűjtöttem génexpressziós vizsgálatra. Így a kísérlet négy mintacsoportot eredményezett: friss kontroll (K), friss hőkezelt (HK), krioprezervált kontroll (KF) és krioprezervált hőkezelt (HKF). A „C” kísérlet munkafolyamatait a 11. ábra szemlélteti.



11. ábra. A „C” kísérlet munkafolyamatainak sematikus ábrázolása

4.2.4. „D” kísérlet – Prolongált embriótenyésztés

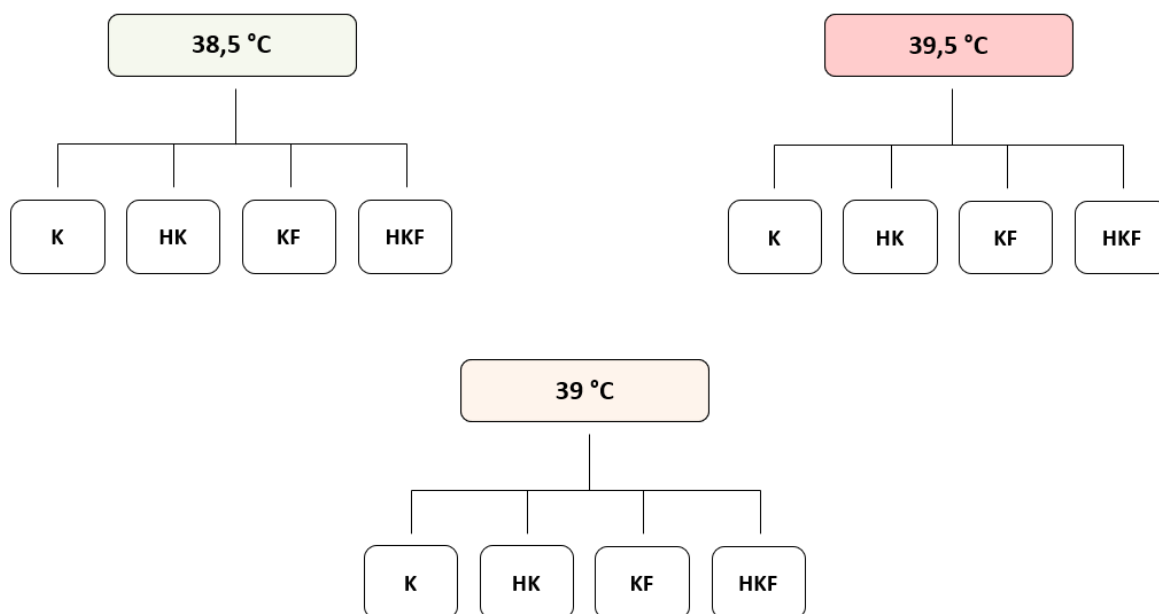
A hosszú távú embriótenyésztés előkészítéséhez az embriók előállítására a „C” kísérletben ismertetett protokollt alkalmaztam. Az embriókat az embriótenyésztés hetedik napján krioprezervációnak vetettük alá, majd a cseppfolyós nitrogénbe helyezést követően a korábban ismertetett protokoll szerint felolvasztottuk. A felolvasztást követően az embriókat BO-IVC tenyésztőműködiumba helyeztük. Az embriótenyésztés nyolcadik napján a friss blasztocisztákat, valamint a krioprezervációt túlélő embriókat előzetesen ekvibrált, 10% (v/v) FBS-t tartalmazó, olajfedéssel ellátott, 30 μ L térfogatú BO-IVC médiumcseppekbe helyeztem individuálisan. Egy tenyésztőedényben 10 embriót helyeztem el. Az egyes tenyésztőedények kizárólag egy adott kísérleti csoport (K, HK, KF vagy HKF) embrióit tartalmazták. A tenyésztőedényeket ezt követően előmelegített, hatkamrás inkubátorba helyeztem, ahol a három alkalmazott tenyésztési hőmérsékletnek megfelelően (38,5; 39,0 és 39,5 °C) külön kamrákban helyeztem el. A vizsgálatban alkalmazott tenyésztési hőmérsékleteket a szakirodalmi adatok (El-Sheikh et al.,

2013; Lees et al., 2018b; López-Gatius–Hunter, 2020; Vitali et al., 2023) alapján becsült méhen belüli hőmérsékleti viszonyok figyelembevételével határoztuk meg. A „D” kísérletben összesen 1343 zigóta tenyésztése során 80%-os átlagos osztódási arányt figyeltem meg. A kísérletet három ismétlésben végeztem, ismétlésenként 160, összesen 480 korai morula stádiumú embrió felhasználásával. Az embriókat minden ismétlésben egyenlő arányban osztottam el a kontroll- és a hőkezelt csoport között (csoportonként n = 80). A hőkezelési, illetve fagyasztási és felolvasztási eljárásokat követően a négy kezelési csoportból összesen 344 életképes embriót vontam be a prolongált tenyésztésbe. A rendelkezésre álló életképes embriók számától függően ismétlésenként és hőmérsékletenként valamennyi kezelési csoportból legfeljebb 10 embriót tenyésztettem, így mindhárom hőmérsékleti kamrában a négy csoport embrióinak tenyésztése egyidejűleg zajlott. Az egyes kísérleti csoportok mintaelemszámait a 3. táblázat foglalja össze. Az embriók túlélését kétnaponta, a tenyésztés 8. (D8), 10. (D10), 12. (D12) és 14. (D14) napján, morfológiai kritériumok alapján, sztereomikroszkóppal értékeltem.

3. táblázat. A kísérleti csoportok mintaelemszámait ismétlésenként

	38,5 °C				39,0 °C				39,5 °C			
	K	KF	HK	HKF	K	KF	HK	HKF	K	KF	HK	HKF
1.	8	10	9	9	9	10	7	10	10	10	9	10
2.	10	10	10	10	9	9	8	9	10	9	9	10
3.	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
SUM	28	30	29	29	28	29	25	29	30	29	28	30

A kísérleti elrendezést a 12. ábra szemlélteti.



12. ábra. A prolongált embriótenyésztési kísérlet kezelési csoportjainak elrendezése a 38,5; 39,0 és 39,5 °C-os inkubációs hőmérsékleteken

4.3. A génexpressziós vizsgálatokhoz történő mintagyűjtés

Az embriókat a blasztociszta stádium elérését követően az IETS, valamint Bó és Mapletoft (2013) ajánlása alapján minősítettem. Az „A” kísérletben a blasztocisztákat Dulbecco-féle foszfátpufferelt sóoldatban (DPBS) mostam át, majd 100 µL RNA Aqueous Lysis Buffer Micro Kitből (Applied Biosystems™, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA) származó lízispuffert tartalmazó Eppendorf-csövekbe gyűjtöttem. A „B” kísérletben a blasztociszták gyűjtése ugyanezen módszerrel történt a túlélési arány meghatározását követően. A „C” kísérlet során a génexpressziós vizsgálatához a tenyésztés 7. és 8. napján, valamint a felolvasztást követő 24. órában csoportonként és biológiai ismétlésenként $n = 15$ blasztociszta stádiumú embriót gyűjtöttem, amelyeket az RNS-izolálás előtt poolozva dolgoztam fel. A vizsgálatot három független biológiai ismétlésben végeztem, mintánként három technikai párhuzamos reakcióval. A gyűjtött mintákat -70 °C -on tároltam a génexpressziós analízis megkezdéséig.

4.4. Génexpresszió vizsgálata

Az RNS-kivonást RNAqueous™-Micro Total RNA Isolation Kit AM1931 (Applied Biosystems™) segítségével végeztük. Az izolált RNS mennyiségét NanoDrop (ND-1000, UV-Vis Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) segítségével ellenőriztük. A SYBR Green qPCR esetében a minta koncentrációjának el kellett érnie a $25\text{ ng}/\mu\text{L}$ -t, míg az Advanced TaqMan qPCR esetében az $5\text{ ng}/\mu\text{L}$ -t. Az mRNS-markerek elemzéséhez a teljes RNS-ből cDNS-t állítottunk elő reverz transzkripció cDNS-szintézis készlet (High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit,

Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) segítségével. A valós idejű polimeráz-láncreakcióhoz (qPCR) a gyártó utasításainak megfelelően SYBR Green PCR-mesterkeveréket használtunk (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). A vizsgálatokat Mastercycler® ep realplex készülékkel (Eppendorf AG, Hamburg, Németország) végeztük. A qPCR során használt primereket a 4. táblázat tartalmazza.

4. táblázat. A valós idejű PCR során használt primerek

mRNS	Forward primer	Reverse primer	Termékméret
EEF1A1*	CCCCAGGACACAGAGACTTC	ATTCACCAACACCAGCAGCA	93
RPS15A	TCAGCCCTAGATTTGATGTGC	TTCCCTCCTGTATGTTTTCTGC	148
HSP90AA1	CTGGAAGGAGACGACGACAC	ACACACTGGAGGGAATGGAG	103
HSPB11	AGAGGAGGCGGAGGACGG	GGTGATAGGGCACGAAGCAA	117
HSPA1A	GGACCTGCTGTTGCTGGAC	TTCGTGGGGATGGTGGAGTT	103
GPX1	GAAAAGTGCGAGGTGAATGG	GAGAGCAGTGGCGTCGTC	93
IGF2R	GGACTACAGGCATCAGGACG	AACACGAAGGGGAACACACA	105
CCNB1	ATACTCCCTCTCCAAGCCCC	ATCCGCTCCGTCTTCTGC	122
DNMT3A	GAAGGAGCATTTGGGAACAG	GTTATTGCGTGAGCCTGGAT	117
PLAC8	GTTTCACAGCCAGGTTACAGC	AGAGCCCCACAGAGACAGAT	104

*referenciagén

Az amplifikációhoz 7,5 µL SYBR Green PCR master mixet (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), 0,75 µL forward és 0,75 µL reverse primert, 4,5 µL nukleázmentes vizet (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) és 1,5 µL cDNS-t mértünk ki mintánként. A qPCR-készülékben beállított program egy kezdeti, 10 perces denaturációs lépést tartalmazott 95 °C-on, amelyet 40 ciklus követett: 15 másodperc 95 °C-on, 40 másodperc 60 °C-on és 20 másodperc 68 °C-on. Az optikai detektálást 68 °C-on végeztük.

A kezelt csoportokban az mRNS-markerek expressziójának meghatározásához referenciagént használtunk (Stamperna *et al.*, 2020). Az *EEF1A1* referenciagént szakirodalmi adatok (Stamperna *et al.*, 2020), valamint a GenEx szoftver 7.0 verziójában NormFinder-elemzés segítségével végzett saját validációnk alapján választottuk ki. A csoportok közötti alacsony variancia arra utalt, hogy a gént nem befolyásolta szisztematikusan a hőkezelés vagy a krioprezerváció. A mintákon ezután qPCR-t végeztünk az embrionális fejlődésre jellemző és hősokkfehérjéket kódoló gének (*RPS15A*, *HSP90AA1*, *HSPB11*, *HSPA1A*, *GPX1*, *IGF2R*, *CCNB1*, *DNMT3A*, *PLAC8*) expressziós profiljának elemzésére.

A miRNS-ek expressziójának meghatározásához TaqMan Advanced miRNA qPCR technológiát alkalmaztunk. A cDNS-szintézist az Applied Biosystems TaqMan Advanced miRNA cDNA Synthesis Kit (katalógusszám: A28007) felhasználásával, a gyártó protokollja szerint végeztük. Az alacsony kiindulási RNS-koncentráció miatt a mintákat hígítás nélkül használtuk fel, a reakcióhoz megengedett maximális mintatérfogot (2 µL) alkalmazásával. A cDNS-szintézis négy egymást követő lépésből állt: poli(A)-farok hozzáadása, adapter-ligáció, reverz transzkripció

(RT), valamint miR-Amp preamplifikáció. Valamennyi lépést a gyártó előírásainak megfelelően hajtottuk végre, beleértve a kiegészítő ajánlásokat (pl. 50%-os PEG 8000 oldat alkalmazása) és az előírt reakcióterfogatok betartását. A hígítatlan miR-Amp reakciótermékeket a valós idejű qPCR-analízis elvégzéséig -80°C -on tároltuk. A qPCR-reakcióelegy elkészítéséhez $4\ \mu\text{L}$ nukleázmentes vizet (katalógusszám: AM9938), $10\ \mu\text{L}$ TaqMan™ Fast Advanced Master Mixet (2×) (Applied Biosystems™, katalógusszám: 4444556), valamint $1\ \mu\text{L}$ TaqMan™ Advanced miRNA Assay-t (20×) (katalógusszám: A25576) mértünk ki. Az egyes komponensek mennyiségét az adott primerrel vizsgált minták számának megfelelően számítottuk ki, majd ennek megfelelően készítettük el a primer-specifikus Master Mixeket (Kozomara *et al.*, 2019; Park *et al.*, 2022; Sengar *et al.*, 2018; Yang *et al.*, 2025). Ezt követően minden Master Mixhez $5\ \mu\text{L}$ cDNS-templátot adtunk, így a reakciók végső cDNS-koncentrációja $0,001\text{--}100\ \text{ng/reakció}$ volt. A vizsgálat során alkalmazott TaqMan™ Advanced miRNA Assay-k felsorolását az 5. táblázat tartalmazza.

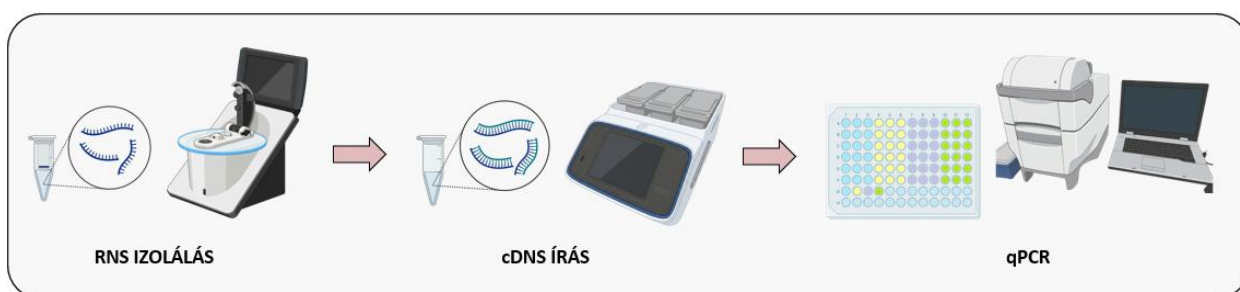
5. táblázat. A vizsgálat során alkalmazott TaqMan™ Advanced miRNA primerek (katalógusszám: A25576)

miRNS	Assay azonosító	miRNS-szekvencia
hsa-miR-92a-3p*	477827_mir	UAUUGCACUUGUCCCGGCCUGU
hsa-miR-191-5p	477952_mir	CAACGGAUCCCAAAAGCAGCUG
hsa-miR-320a-3p	478594_mir	AAAAGCUGGGUUGAGAGGGCGA
hsa-miR-372-3p	478071_mir	AAAGUGCUGCGACAUUUGAGCGU
hsa-miR-378a-3p	478349_mir	ACUGGACUUGGAGUCAGAAGGC
hsa-miR-138-5p	477905_mir	AGCUGGUGUUGUGAAUCAGGCCG

* referencia-miRNS

Minden assay esetében negatív kontrollreakciót is futtattunk. Minden mintát három technikai párhuzamban (tripletben) vizsgáltunk az egyes célzott miRNS-ek expressziójának meghatározása érdekében. A miR-92a-3p-t endogén referencia-miRNS-ként (belső kontrollként) alkalmaztuk a génexpressziós adatok normalizálásához.

A génexpressziós analízis munkafolyamatait a 13. ábra szemlélteti.



13. ábra. A génexpressziós vizsgálat munkafolyamatainak sematikus ábrázolása

4.5. Apoptózis- és nekrozisfestés

Az embriók apoptózis- és nekrozisfestését kereskedelmi forgalomban elérhető FITC–Annexin V Apoptosis and Necrosis Detection Kit (PromoKine, Heidelberg, Németország; PK-CA707-30018) alkalmazásával végeztük. Az 1× kötőpuffert 100 µL 5× kötőpuffer és 400 µL steril, embrióminőségű víz elegyítésével készítettük el. A festőoldat 100 µL 1× kötőpufferből, 5 µL FITC–Annexin V-ből, 5 µL Ethidium Homodimer III-ból és 5 µL Hoechst 33342-ből állt. A keveréket óvatosan homogenizáltuk, majd alumíniumfóliával letakarva fénytől védve tartottuk. Az embriókat 50 µL festőoldatot tartalmazó cseppekben, szobahőmérsékleten, sötétben 15 percig inkubáltuk. Az inkubációt követően a mintákat 200 µL 1× kötőpuffer hozzáadásával mostuk át. A Hoechst 33342-t a sejtmagok jelölésére, a FITC–Annexin V-t az apoptózis során bekövetkező foszfatidil-szerin externalizáció kimutatására, míg az Ethidium Homodimer III-at a membránintegritásukat elvesztett nekrotikus sejtek azonosítására alkalmaztuk. A fluoreszcens képalkotást ImageXpress® Pico Automated Cell Imaging System (Sunnyvale, Kalifornia, USA) készülékkel végeztük DAPI/Hoechst, FITC és Texas Red szűrők alkalmazásával. Az apoptózis- és nekrozisfestés során 16 kontroll- és 17 hőkezelt embriót vizsgáltunk.

4.6. Immunfestés

Az immunfestés megkezdése előtt az embriókat szobahőmérsékleten 1 percig 0,1% szarvasmarha-szérumalbumint (BSA) tartalmazó 1 × PBS-oldatban mostam, majd 4% paraformaldehidet és 0,1% BSA-t tartalmazó fixálóoldatban 10 percig fixáltam. A fixálást követően az embriókat 0,01% BSA-t tartalmazó PBS-oldatban mostam át, majd a további feldolgozásig 4 °C-on, fénytől védve tároltam. A permeabilizálást és a nem specifikus kötőhelyek blokkolását blokkolóoldatban, szobahőmérsékleten 40 percig végeztük. Ezt követően az embriókat 0,1% BSA-t tartalmazó PBS-oldatban hígított elsődleges antitestekkel inkubáltuk sötét környezetben, egy éjszakán át 4 °C-on. Az alkalmazott elsődleges antitestek a nyúl monoklonális anti-CDX2 (1:100; Abcam, ab76541) és a nyúl monoklonális anti-OCT4 (1:100; Abcam, ab181557) voltak. Három, 0,01% BSA-t tartalmazó PBS-oldattal végzett mosási lépést követően az embriókat kecske eredetű, Abberior STAR RED fluorofórral konjugált anti-nyúl másodlagos antitesttel (1:200; Abberior/Unicam) inkubáltuk 1 órán át, 37 °C-on, sötét környezetben. A sejtmagok ellenfestését TO-PRO-3 joddal (1:500; Thermo Fisher Scientific) végeztük 15 percig szobahőmérsékleten. További mosási lépéseket követően az embriókat antifade beágyazó közegbe (Abberior Mount Liquid Antifade, Unicam) helyeztük, fedőlemezzel lefedtük, majd a konfokális mikroszkópos vizsgálatig 4 °C-on, fénytől védve tároltuk. A minták vizsgálatát konfokális lézerpásztázó mikroszkóppal (TCS SP8, Leica Microsystems IR GmbH, Wetzlar, Hessen,

Németország) végeztük. Az immunfluoreszcens festés során 15 kontroll- és 13 hőkezelt embriót vizsgáltunk.

4.7. Statisztikai értékelés

Az egyes kezelések hatásának vizsgálatára általánosított lineáris vegyes modellt (Generalized Linear Mixed Model, GLMM) alkalmaztunk binomiális hibaszerkezettel és logit kapcsolati függvénnyel. A modellek illesztése maximum-likelihood becsléssel, Laplace-közelítés alkalmazásával történt az R statisztikai környezet (4.6.0 verzió) lme4 csomagjának glmer() függvényével. A blasztociszta-arányok elemzése során a kezelést fix hatásként, míg az ismétlést és a tenyésztőcseppet véletlen hatásként vettük figyelembe annak érdekében, hogy kezeljük az azonos tenyésztési cseppben fejlődő embriók, valamint a különböző kísérleti ismétlésekből származó minták közötti függőséget. Az embriók felolvasztás utáni túlélésének elemzése során a kezelés fix hatásként, míg az ismétlés véletlen hatásként szerepelt a modellben. Az egyes kezelési csoportok közötti páronkénti összehasonlításokat Tukey-korrekciónal végeztük az R multcomp csomagjának glht() függvényével.

A prolongált tenyésztés során az embriók túlélését általánosított lineáris vegyes modellekkel elemeztem binomiális eloszlás és logit kapcsolófüggvény alkalmazásával az R statisztikai környezetben (R 4.5.0 verzió), az lme4 csomag glmer() függvényével. Mivel ugyanazon embriók túlélését több időpontban követtem nyomon (D8, D10, D12 és D14), az első elemzés célja a prolongált tenyésztés alatti túlélés általános értékelése volt. A D8 időpont kizárólag a túlélési görbék kiindulási pontjaként szolgált, azonban a GLMM elemzésből kizártam, mivel ezen a napon valamennyi embrió életben volt, ami a binomiális modellben teljes szeparációt (complete separation) eredményezett volna. Ezért a fő modell kizárólag a D10, D12 és D14 időpontokat tartalmazta. Ebben a modellben a tenyésztési hőmérséklet (38,5 °C; 39,0 °C és 39,5 °C), a hőkezelés, a krioprezerváció és a tenyésztési nap fix hatásként, míg a biológiai ismétlés random hatásként szerepelt. A modell segítségével meghatároztam, hogy a prolongált tenyésztés során a túlélési arányt befolyásolta-e a tenyésztési hőmérséklet, a hőkezelés, a krioprezerváció vagy a tenyésztés időtartama. Mivel a vizsgálat elsődleges biológiai kérdése az volt, hogy a hőkezelés javítja-e az embriók túlélését magasabb tenyésztési hőmérsékleten, illetve krioprezervációt követően, ezt egy második, célzott elemzésben értékeltem, melynek során a D10, D12 és D14 időpontokat külön-külön elemeztem. Minden időpontra külön GLMM modellt illesztettem, amelyben a tenyésztési hőmérséklet, a hőkezelés, a krioprezerváció, valamint ezek valamennyi két- és háromutas interakciója fix hatásként szerepelt, míg a biológiai ismétlés random hatásként került a modellbe. A modellek szignifikanciáját III. típusú Wald-féle khi-négyzet-

próbával vizsgáltam a car csomag Anova() függvényével. A kontroll és hőkezelt embriók túlélési valószínűségeit minden hőmérséklet–krioprezerváció kombinációban becsült marginális átlagok (estimated marginal means) segítségével határoztam meg az emmeans csomag alkalmazásával. A páronkénti összehasonlításokat Holm-korrekciónal módosítottam a többszörös összehasonlításból adódó hibák csökkentése érdekében. Az eredményeket becsült túlélési valószínűségként (estimated survival probability), esélyhányadosként (odds ratio), valamint 95%-os konfidenciaintervallummal adtam meg. A szignifikancia határát $p < 0,05$ értékben állapítottam meg.

Az embriók prolongált tenyésztés alatti túlélésének szemléltetésére a D8, D10, D12 és D14 tenyésztési napokon meghatározott túlélési arányokat grafikus formában is ábrázoltam. A D8 időpont szolgált a tenyésztés kiindulási időpontjaként, ezért a későbbi túlélési arányokat a tenyésztés 8. napján életben lévő embriókhoz viszonyítva számítottam. A túlélési arányokat minden tenyésztési hőmérséklet (38,5 °C; 39,0 °C és 39,5 °C), valamint minden kezelési csoport (K, HK, KF és HKF) esetében külön határoztam meg az adott időpontban életben maradt embriók számának és a D8 időpontban életben lévő embriók számának hányadosaként, százalékos formában. Az ábrákat az R statisztikai környezetben a ggplot2 csomag segítségével készítettem. A tenyésztési hőmérsékleteket külön panelek (facet), míg a kezelési csoportokat eltérő színű vonalak és pontok jelölték. A grafikonok a prolongált tenyésztés során bekövetkező túlélési arányok időbeli változását szemléltetik. A tenyésztés során elpusztult embriókat a későbbi időpontokban is elpusztultként vettük figyelembe, így egy embrió a tenyésztés során elvesztett életképességét nem nyerhette vissza.

Az RT-qPCR eredményeinek feldolgozását az Eppendorf RealPlex szoftverrel végeztük. A kapott adatokat ezt követően a MultiD GenEx qPCR Data Analysis szoftver (7.0 verzió; <http://www.multid.se>) segítségével elemeztük. A qPCR-adatok normalizálásához legalkalmasabb referenciagének kiválasztását a GenEx szoftverbe (7.0 verzió) integrált NormFinder algoritmus segítségével végeztük. Az elemzés alapján az EEF1A1 gént és a miR-92a-3p miRNS-t választottuk belső kontrollnak. Az „A” és „B” kísérletben az expressziós különbségeket a kontrollcsoporthoz viszonyított fold change ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) értékeken, Student-féle t-próbával értékeltük, összhangban a Nagy *et al.* (2026) közleményben alkalmazott eljárással. A „C” kísérletben az elemzést a referenciagéntre normalizált ΔCt -értékeken végeztük egyszempontos varianciaanalízissel, majd Student-féle t-próbával, mivel a ΔCt -értékek eloszlása a fold change-értékeknél kevésbé ferde; az eredményeket a szemléltetés érdekében $2^{-\Delta Ct}$ formában, átlag $\pm$ SEM alakban közöljük. Mindhárom kísérletben az RNS-t csoportonként és ismétlésenként poolozva izoláltuk, ezért az elemzés biológiai egysége a kísérleti ismétlés ($n = 3$), nem az egyedi embrió; a mintánként futtatott három reakció technikai párhuzamos. A $p < 0,05$ értéket statisztikailag szignifikánsnak tekintettük.

Az önszerveződő térképen (Self-organizing Map, SOM) alapuló hierarchikus klaszterezési eljárást az expressziós mintázatok közötti különbségek és a minták közötti hasonlóságok szemléltetésére alkalmaztuk. A SOM lehetővé tette a minták előre meghatározott számú csoportba történő rendezését az expressziós hasonlóságok alapján. A SOM algoritmus a többdimenziós mRNS- és miRNS-expressziós adatokat kétdimenziós térbe vetítette, amelynek eredményeként a hasonló expressziós profillal rendelkező minták egymáshoz közelebb, míg az eltérő expressziós mintázatot mutató minták távolabb helyezkedtek el. Ennek megfelelően az ábrák értelmezése során a legfontosabb információt a minták egymáshoz viszonyított elhelyezkedése adta.

A disszertáció egyes részei a szerző korábban megjelent tudományos közleményének felhasználásával készültek. Az Anyag és módszer fejezet egyes részei, az „A” és „B” kísérlet eredményeit, az apoptózis-, nekrosis- és immunfestési vizsgálatok eredményeit, valamint a diszkusszió egyes részeit a következő közleményben részben közzétük: Nagy *et al.*, 2026.

5. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK

Számos irodalmi adat igazolja, hogy a génexpressziós mintázatok érzékenyen reagálnak az embrió fejlődési stádiumára (Jiang *et al.*, 2014; Jiang, 2025; Kues *et al.*, 2008; Wei *et al.*, 2017). Mivel az embrionális fejlődés egy dinamikus folyamat, nehéz egyértelműen elkülöníteni a kezelések által kiváltott változásokat a fejlődési stádiumból eredő különbségektől. Vizsgálatunk során ezért biztosítottuk, hogy a mérések minden esetben blasztociszta stádiumú embriókon történjenek, és az egyes kezelések génexpressziós szintjeit minden kísérleti ismételtesben a megfelelő kontrollcsoport értékeihez viszonyítva értékeltük. A kontroll- és hőkezelt csoportokat minden ismételtesen belül hasonlítottuk össze, mivel a különböző kísérleti ismételtesek kontroll embrióinak génexpressziós profiljai is eltéréseket mutattak, amelyek feltehetően a donor tehének eltérő környezeti hatásaiból és az egyedi biológiai különbségekből adódhattak.

5.1. Blasztociszta és túlélési arányok elemzése

5.1.1. „A” kísérlet

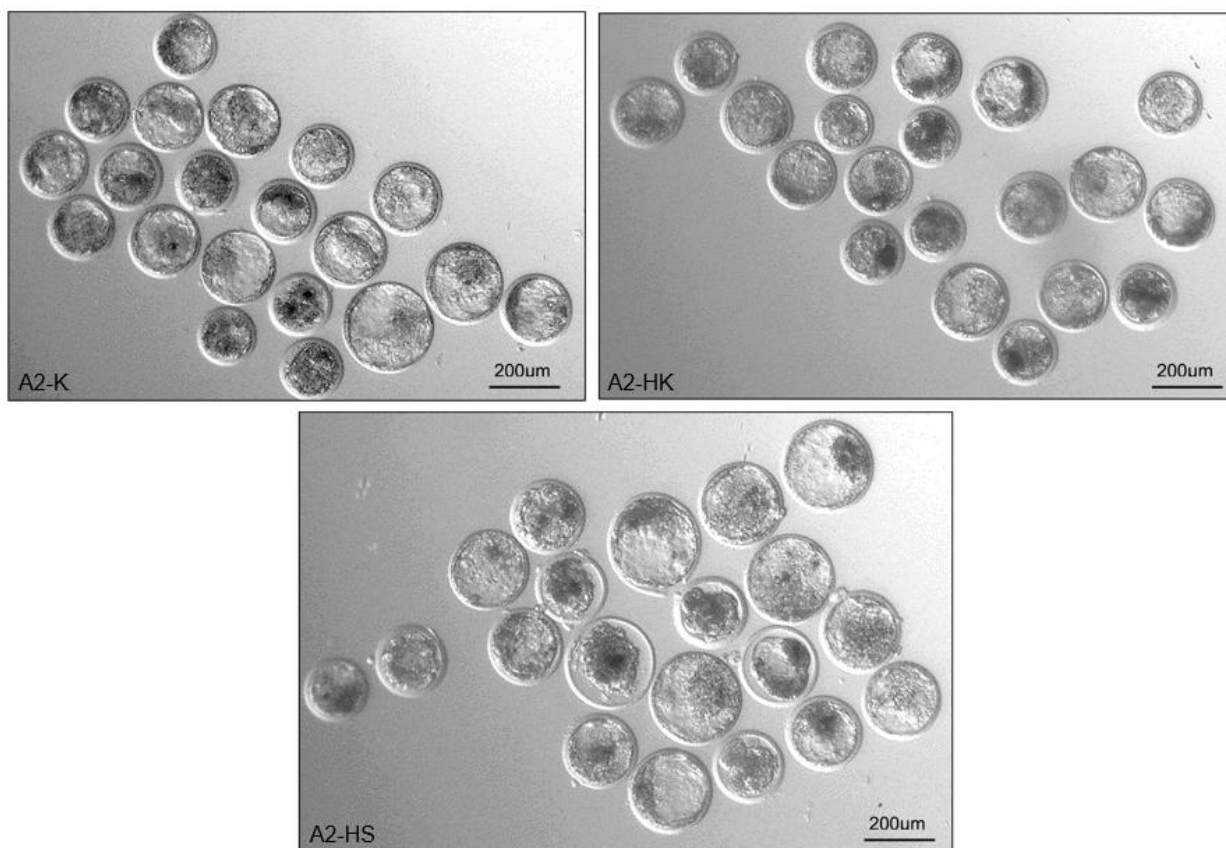
Az egyes ismételtesekben meghatározott blasztociszta-arányokat a 6. táblázat szemlélteti.

6. táblázat. Blasztociszta-arányok alakulása az egyes ismételtesek során

Ismételtes	Kísérleti csoport	Blasztociszták száma	Blasztociszták aránya (%)
A1	K	10	50,0 ± 25,8
	HK	10	50,0 ± 20,0
	HS	7	35,0 ± 10,0
A2	K	25	62,5 ± 32,8
	HK	29	72,5 ± 18,3
	HS	27	67,5 ± 26,0
A3	K	12	40,0 ± 28,3
	HK	16	53,3 ± 16,4
	HS	12	40,0 ± 21,9

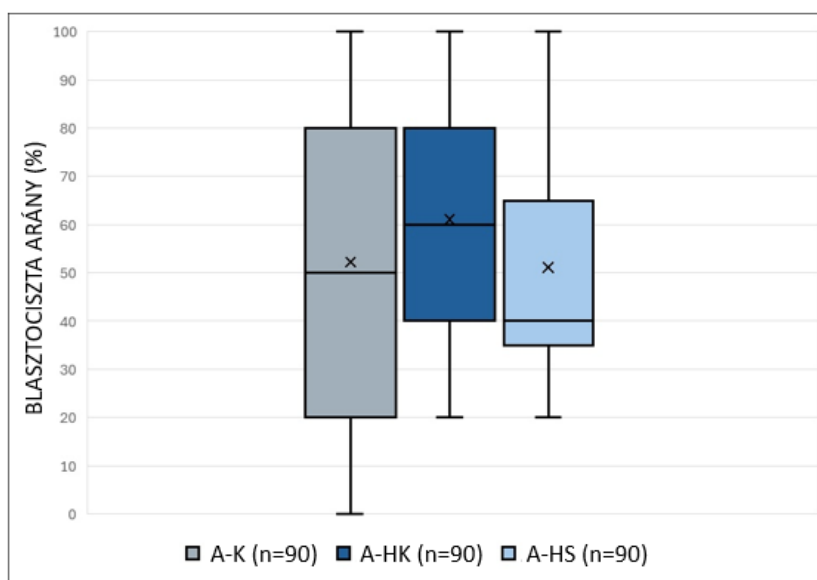
*±: az egyes biológiai ismételteseken belül a tenyésztési cseppek közötti szórás

Az „A” kísérlet második biológiai ismételtese (A2) során a blasztociszta stádiumig fejlődött embriókat a 14. ábra szemlélteti.



14. ábra. Az „A2” biológiai ismételtes során a blasztociszta stádiumot elért embriók

A három biológiai ismételtes átlagos blasztociszta-arányait a 15. ábra szemlélteti.



15. ábra. Az „A” kísérlet átlagos blasztociszta-arányai

A csoportok közötti páronkénti összehasonlítások alapján a blasztociszta-arányok tekintetében egyik kezelési csoportpár között sem volt kimutatható statisztikailag igazolható különbség (K–HK: $p = 0,464$, K–HS: $p = 0,988$, HK–HS: $p = 0,381$). A modell által becsült blasztociszta képződési valószínűségek 50,3% (kontroll), 59,9% (HK) és 49,2% (HS) voltak.

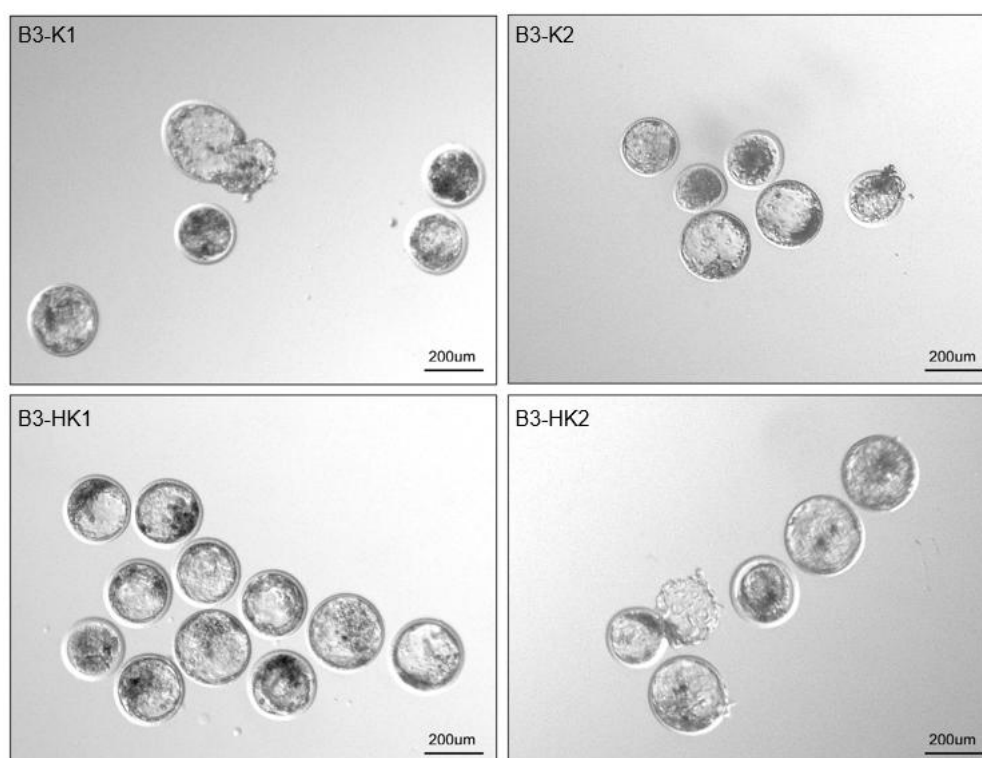
5.1.2. „B” kísérlet

A felolvasztás utáni túlélési arányok mind a kontroll-, mind a hőkezelt csoportban az egyes kísérleti ismétlések között eltérést mutattak. A felolvasztás utáni túlélési arányokat a 7. táblázat foglalja össze.

7. táblázat. Túlélési arányok alakulása az egyes ismétlések során

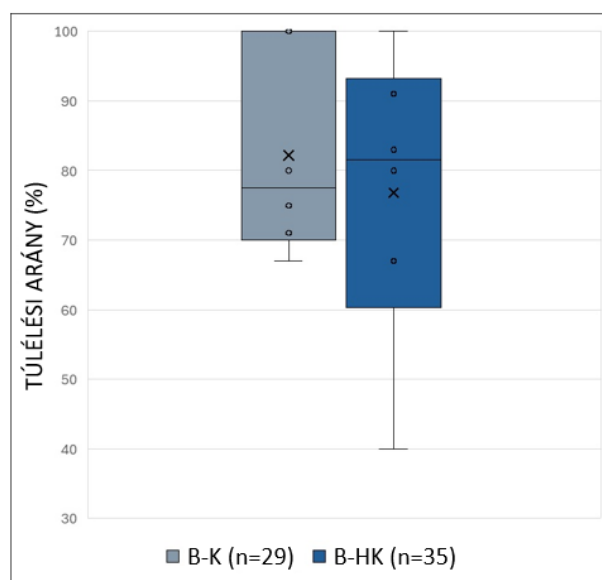
Ismétlés	Kísérleti csoport	Túlélő	
		blasztociszták száma	Túlélési arány (%)
B1	K	7	100
	HK	7	75
B2	K	8	73
	HK	6	60
B3	K	8	73
	HK	15	95

A „B3” biológiai ismétlés során analízisre gyűjtött embriókat a 16. ábra szemlélteti 24 órával a felolvasztást követően.



16. ábra. A „B3” biológiai ismétlés kontroll- és hőkezelt embriói 24 órával a felolvasztást követően

A kontrollcsoportban a felolvasztás utáni túlélési arány 73% és 100% között, míg a hőkezelt csoportban 60% és 95% között változott az egyes biológiai ismétlések során. A három ismétlés alapján számított átlagos túlélési arányokat a 17. ábra szemlélteti.



17. ábra. A felolvasztott embriók átlagos túlélési arányai a „B” kísérlet során

A kezelés nem gyakorolt statisztikailag igazolható hatást a felolvasztás utáni túlélésre ($p = 0,957$). A modell alapján becsült túlélési valószínűség a kontrollcsoportban 79,3% (23/29), a hőkezelt csoportban pedig 80,0% (28/35) volt. A kísérletek közötti variabilitás alacsonynak bizonyult ($SD = 0,16$).

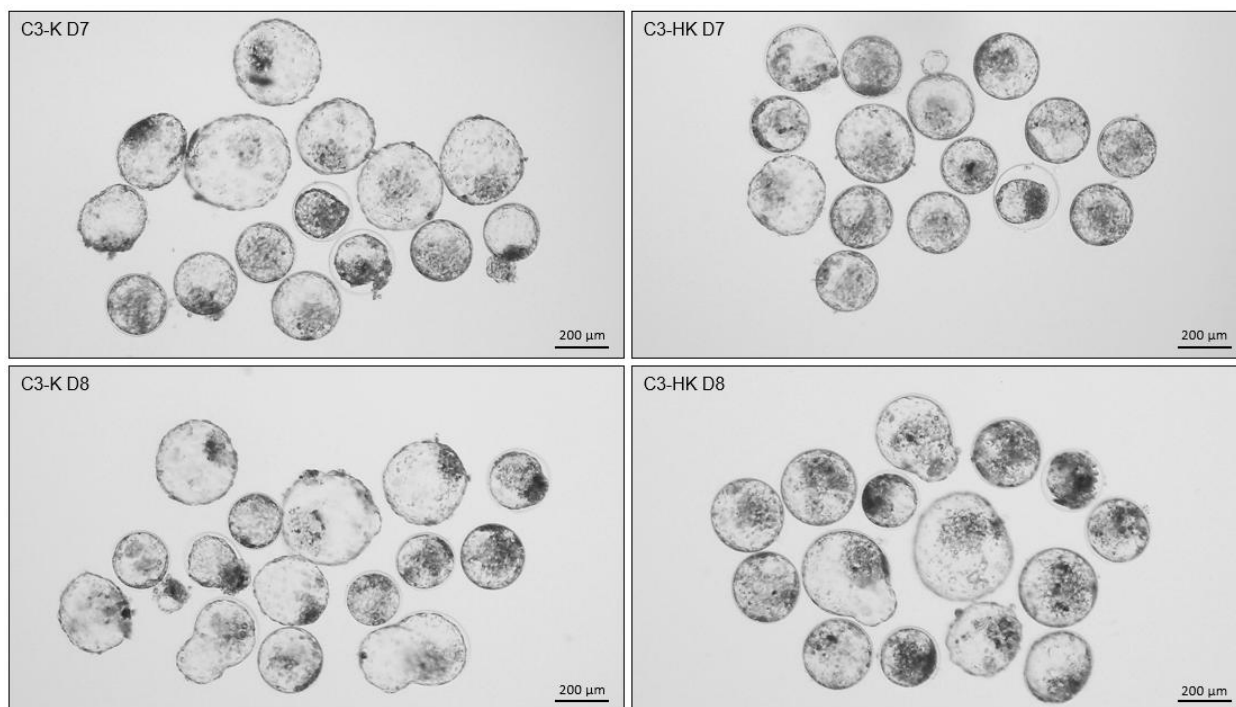
5.1.3. „C” kísérlet

Az egyes ismétlésekben meghatározott blasztociszta-arányokat a 8. táblázat szemlélteti.

8. táblázat. Blasztociszta-arányok alakulása az egyes ismétlések során

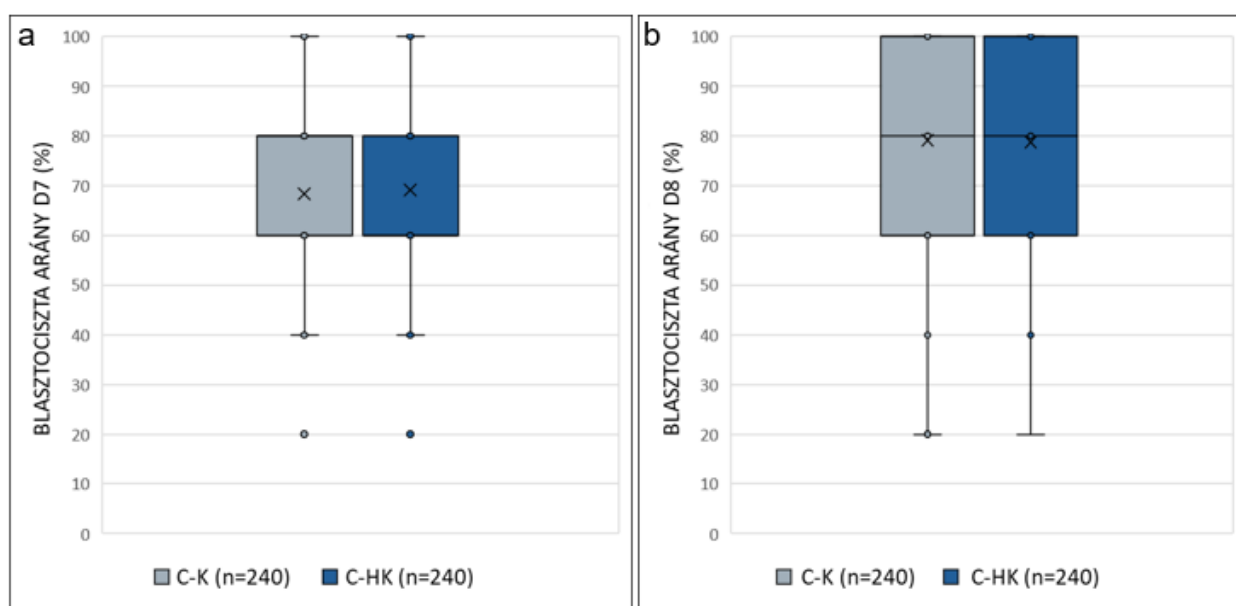
Ismétlés	Kísérleti nap	Kísérleti csoport	Blasztociszta-k száma (db)	Blasztociszta-arány (%)
C1	7	K	49	61,3 ± 27,5
		HK	54	67,5 ± 30,6
C2	7	K	57	71,3 ± 22,7
		HK	58	72,5 ± 17,9
C3	7	K	58	72,5 ± 19,6
		HK	54	67,5 ± 15,7
C1	8	K	53	66,3 ± 26,6
		HK	61	76,3 ± 22,9
C2	8	K	69	86,3 ± 13,0
		HK	69	86,3 ± 13,7
C3	8	K	68	84,0 ± 13,8
		HK	59	73,8 ± 16,2

A „C3” kísérlet során analízisre gyűjtött embriókat a 18. ábra szemlélteti. Az embriótenyésztés 7. és 8. napján egyaránt előre meghatározott számú ($n = 15$) blasztociszta stádiumot elért embriókat gyűjtöttem a génexpressziós analízis elvégzéséhez.



18. ábra. A „C3” kísérlet analízisre gyűjtött kontroll- és hőkezelt embriói

A három ismételtes alapján számított átlagos blasztociszta-arányokat az embriótenyésztés 7. és 8. napján a 19. ábra szemlélteti.

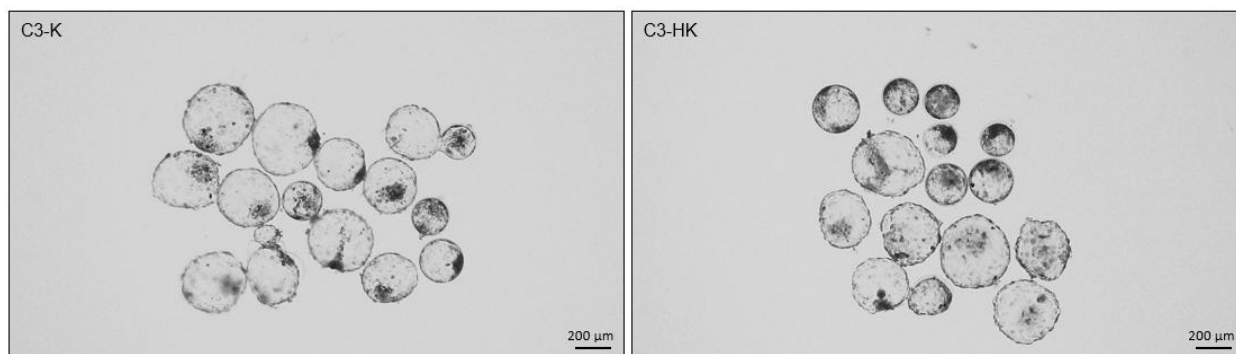


19. ábra. A „C” kísérlet átlagos blasztociszta-arányai a tenyésztés (a) 7. és (b) 8. napján

A „C” kísérlet során megállapított túlélési arányokat a 9. táblázat mutatja be. Az analízisre gyűjtött mélyhűtött embriókat a 20. ábra szemlélteti 24 órával a felolvasztást követően.

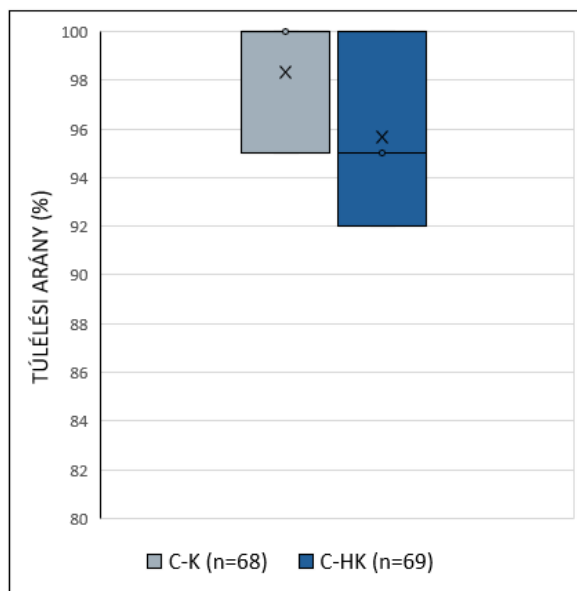
9. táblázat. Túlélési arányok alakulása az egyes ismétlések során

Ismétlés	Kísérleti csoport	Túlélő blasztociszták száma	Túlélési arány (%)
C1	K	19	95
	HK	19	95
C2	K	23	100
	HK	24	100
C3	K	25	100
	HK	23	92



20. ábra. A „C3” kísérlet kontroll- és hőkezelt embriói 24 órával a felolvasztást követően

A három ismétlés alapján számított átlagos túlélési arányokat a 21. ábra szemlélteti.



21. ábra. A felolvasztott embriók átlagos túlélési arányai a „C” kísérlet során

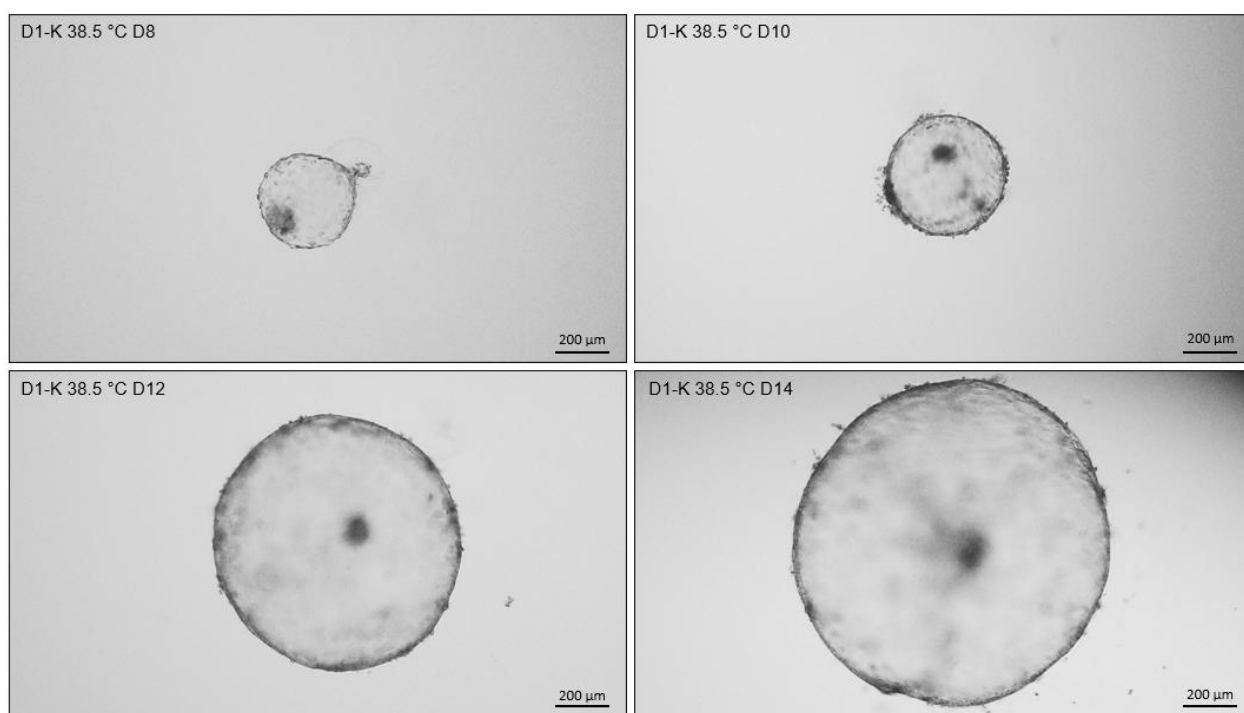
Az általánosított lineáris vegyes modell elemzése alapján a hőkezelés nem gyakorolt szignifikáns hatást az embriók fejlődésére. A blasztociszta-arány a kontroll- és a hőkezelt csoport között sem a tenyésztés 7. napján (68,3%, 164/240 és 69,2%, 166/240; $p = 0,844$), sem annak 8. napján (79,2%, 190/240 és 78,8%, 189/240; $p = 0,910$) nem különbözött szignifikánsan.

Hasonlóképpen, a felolvasztást követő túlélési arányban sem volt kimutatható szignifikáns különbség a kontroll- (98,5%, 67/68) és a hőkezelt csoport (95,7%, 66/69) között ($p = 0,340$).

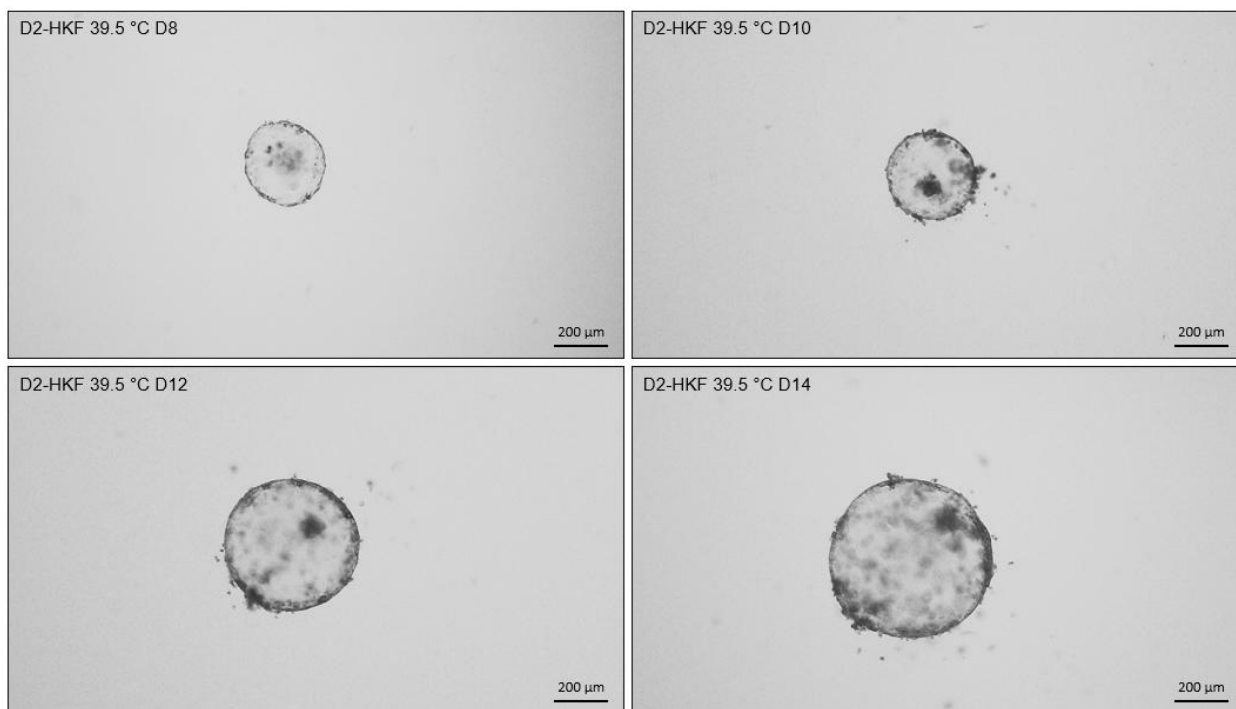
5.1.4. „D” kísérlet

Az embriótenyésztés 8. napján, amely megegyezett a fagyasztott embriók felolvasztását követő 24 órás tenyésztési idővel, a friss és a felolvasztott csoportokból egyaránt kiválasztottam az életképes blasztocisztákat, amelyeket ezt követően prolongált tenyésztésnek vetettem alá.

A hosszú távú embriótenyésztés során megfigyelhető morfológiai változásokat a 22. és 23. ábra szemlélteti.

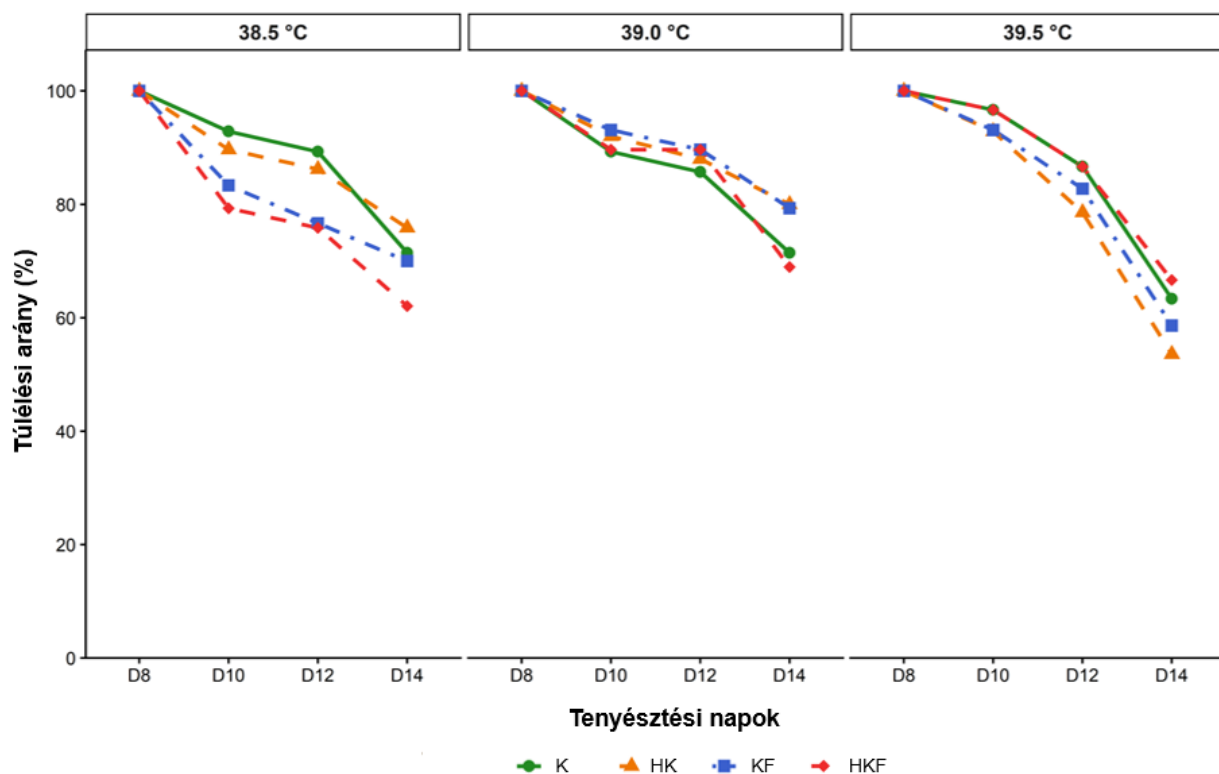


22. ábra. *In vitro* előállított szarvasmarha blasztociszta morfológiai változásai prolongált tenyésztés során a 38,5 °C-on tenyésztett kontrollcsoportban (K) (D8–D14)

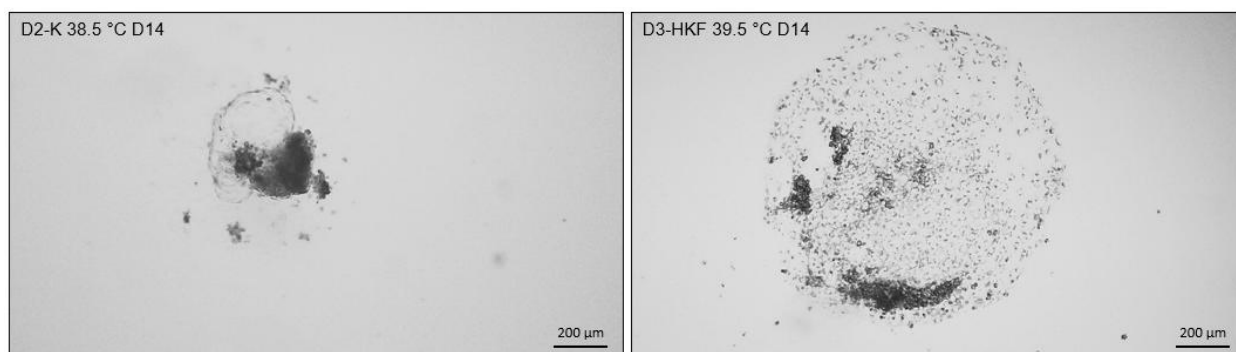


23. ábra. *In vitro* előállított szarvasmarha blasztociszta morfológiai változásai prolongált tenyésztés során a 39,5 °C-on tenyésztett hőkezelt és krioprezervált (HKF) csoportban (D8–D14)

A tenyésztés során az embriók túlélési aránya valamennyi kezelési csoportban fokozatosan csökkent a tenyésztési idő előrehaladtával (24. ábra), miközben egyre nagyobb arányban fordultak elő morfológiai rendellenességeket mutató, valamint összeesett blasztociszták (25. ábra).



24. ábra. Az embriók túlélési arányának alakulása prolongált tenyésztés során a különböző tenyésztési hőmérsékleteken és kezelési csoportokban. Az ábra a D8, D10, D12 és D14 időpontokban meghatározott túlélési arányokat mutatja a kontroll (K), hőkezelt (HK), krioprezervált kontroll (KF) és krioprezervált hőkezelt (HKF) csoportokban, külön a 38,5; 39,0 és 39,5 °C-os tenyésztési hőmérsékleteken.



25. ábra. Abnormális morfológiájú és összeesett blasztociszta a tenyésztés 14. napján

Mivel a 8. tenyésztési napon valamennyi vizsgált embrió életben volt, ez az időpont kizárólag a túlélési görbék kiindulási pontjaként szolgált, és a statisztikai elemzésből kizártam. A D10–D14 időszak együttes értékelésére alkalmazott általánosított lineáris vegyes modell (GLMM) alapján a tenyésztési nap szignifikáns hatást gyakorolt az embriók túlélésére ($p < 0,001$), igazolva, hogy a hosszú távú tenyésztés során az embriók életképessége az idő előrehaladtával folyamatosan

csökkent. Ezzel szemben sem a tenyésztési hőmérséklet ($p = 0,134$), sem a hőkezelés ($p = 0,631$), sem a krioprezerváció ($p = 0,319$) nem gyakorolt szignifikáns főhatást a túlélésre. A hőkezelés és a krioprezerváció közötti interakció szintén nem bizonyult szignifikánsnak ($p = 0,961$). A túlélési görbéket bemutató ábra alapján valamennyi kezelési csoportban hasonló csökkenő tendencia volt megfigyelhető, és egyik kezelés sem eredményezett tartós túlélési előnyt a prolongált tenyésztés során.

Tekintettel arra, hogy a vizsgálat elsődleges célja annak meghatározása volt, hogy a hőkezelés javítja-e az embriók túlélését emelt tenyésztési hőmérsékleten, illetve krioprezervációt követően, a D10, D12 és D14 tenyésztési napokat külön-külön is elemeztük faktoriális GLMM alkalmazásával. A tenyésztési hőmérséklet és a hőkezelés közötti interakció egyik vizsgált időpontban sem volt szignifikáns (D10: $p = 0,710$; D12: $p = 0,924$; D14: $p = 0,495$), ami arra utal, hogy a hőkezelés hatása nem függött a tenyésztési hőmérséklettől. Hasonlóképpen, a hőkezelés és a krioprezerváció közötti interakció sem bizonyult szignifikánsnak (D10: $p = 0,889$; D12: $p = 0,786$; D14: $p = 0,472$), így a hőkezelés nem javította szignifikánsan a krioprezervált embriók túlélését. A tenyésztési hőmérséklet, a hőkezelés és a krioprezerváció háromutas interakciója szintén nem érte el a statisztikai szignifikancia szintjét egyik tenyésztési napon sem (D10: $p = 0,563$; D12: $p = 0,762$; D14: $p = 0,270$), ami arra utal, hogy a hőkezelés hatása egyidejűleg sem a tenyésztési hőmérséklettől, sem a krioprezervációtól nem függött. A Holm-korrekcióval végzett páronkénti összehasonlítások egyik esetben sem mutattak szignifikáns különbséget a hőkezelt és a nem hőkezelt csoportok között (D10: $p = 0,516-0,725$; D12: $p = 0,405-1,000$; D14: $p = 0,370-0,702$).

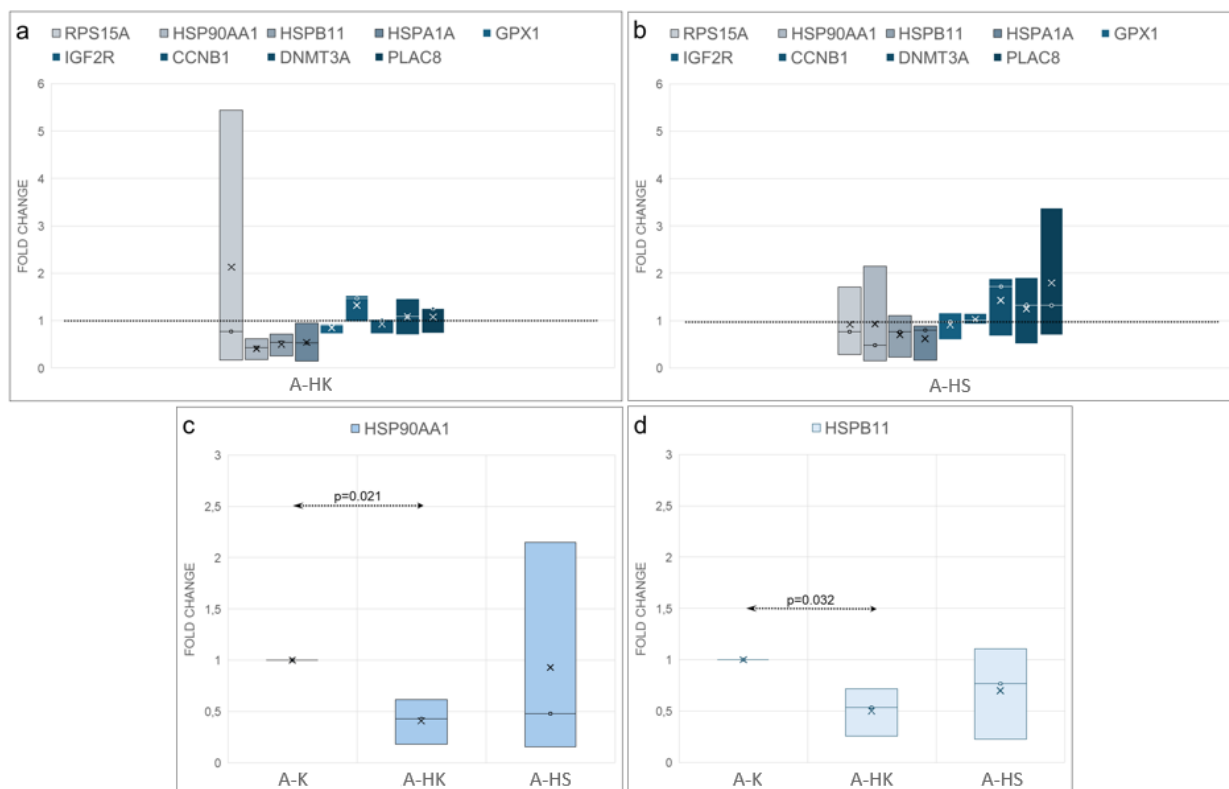
Összességében a hosszú távú tenyésztés során végzett statisztikai elemzések nem szolgáltatott bizonyítékot arra, hogy a hőkezelés szignifikánsan javítaná az embriók túlélését sem emelt tenyésztési hőmérsékleten, sem krioprezervációt követően.

5.2. Génexpressziós mintázatok analízise

5.2.1. „A” kísérlet

Az „A” kísérlet (A_K, A_HK és A_HS) során meghatároztuk számos, az embrionális fejlődés szempontjából kulcsfontosságú, valamint a hőstresszhez kapcsolódó gén expressziós szintjét. A vizsgált gének relatív expressziós szintjeit a két kezelt csoportban (HK: hőkezelt; HS: hősokk), a kontrollcsoporthoz viszonyítva a 26a. és 26b. ábra mutatja be. Az expressziós értékeket az *EEF1A1* referenciagénhez normalizáltuk, ahol a kontrollcsoport értéke 1. A 26c. és 26d. ábrák a *HSP90AA1* és a *HSPB11* gének hőkezelésre, illetve hősokkra adott expressziós válaszát szemléltetik. Mindkét esetben a hőkezelés a *HSP90AA1* ($p = 0,021$) és a *HSPB11* ($p = 0,032$)

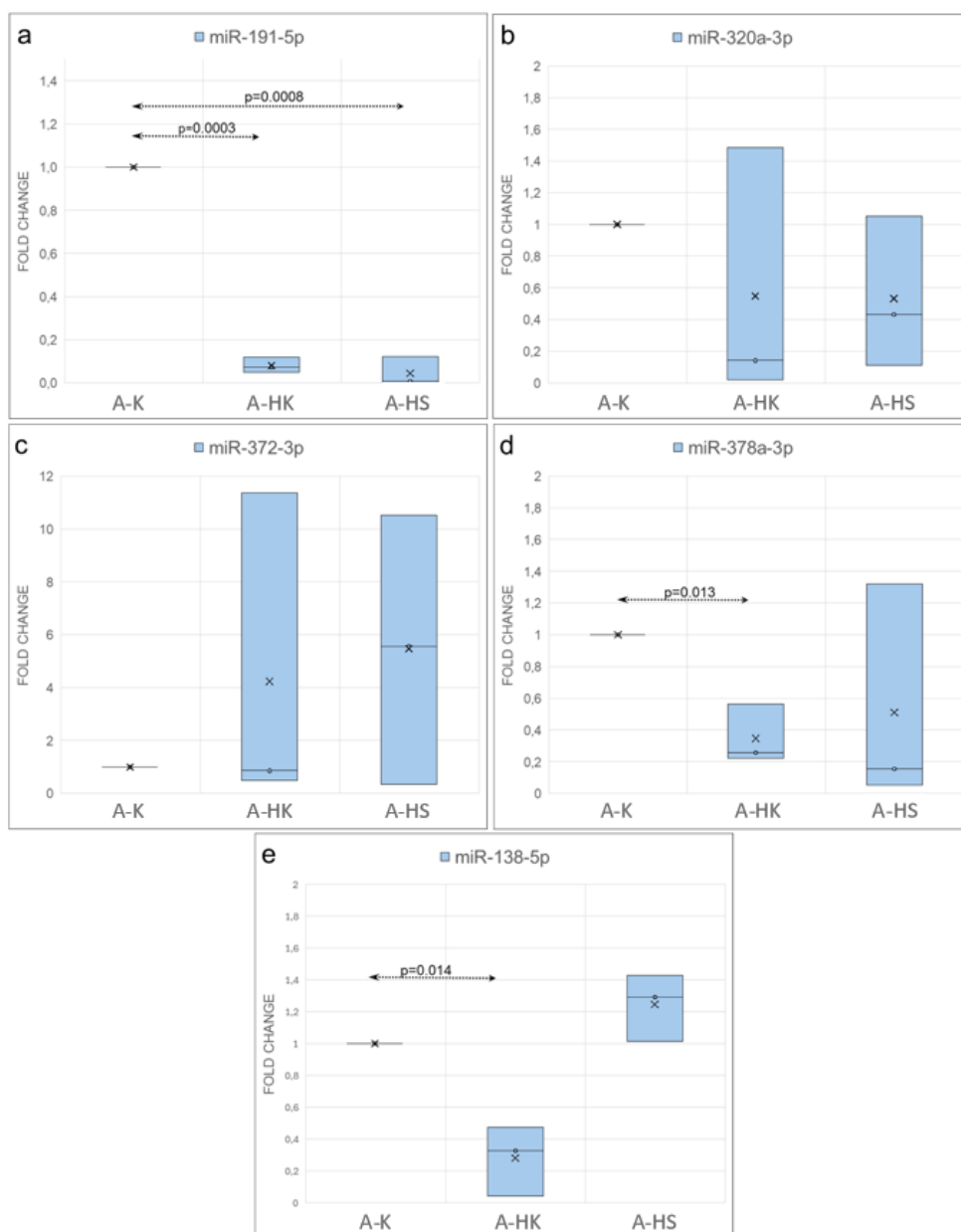
expressziós szintjének szignifikáns csökkenését eredményezte. Az embriók hőstresszre adott génexpressziós válasza jelentős egyedi variabilitást mutatott, amelynek következtében a vizsgált csoportokban a szórás magas volt.



26. ábra. (a) A vizsgált gének relatív expressziós szintjei a hőkezelt csoportban; (b) a vizsgált gének relatív expressziós szintjei a hősokk-kezelt csoportban; (c) a *HSP90AA1* gén relatív expressziós szintje ($p = 0,021$); (d) a *HSPB11* gén relatív expressziós szintje ($p = 0,032$).

Az „A” kísérletből származó mintákban több miRNS expressziós szintjét is meghatároztuk. A 27. ábra a miR-191-5p, a miR-372-3p, a miR-378a-3p, a miR-138-5p és a miR-320a-3p relatív expressziós szintjeit mutatja be a kezelt csoportokban a kontrollcsoporthoz viszonyítva. Az expressziós értékeket a miR-92a-3p referencia-miRNS-hez normalizáltuk, a kontrollcsoport értékét 1-nek tekintve.

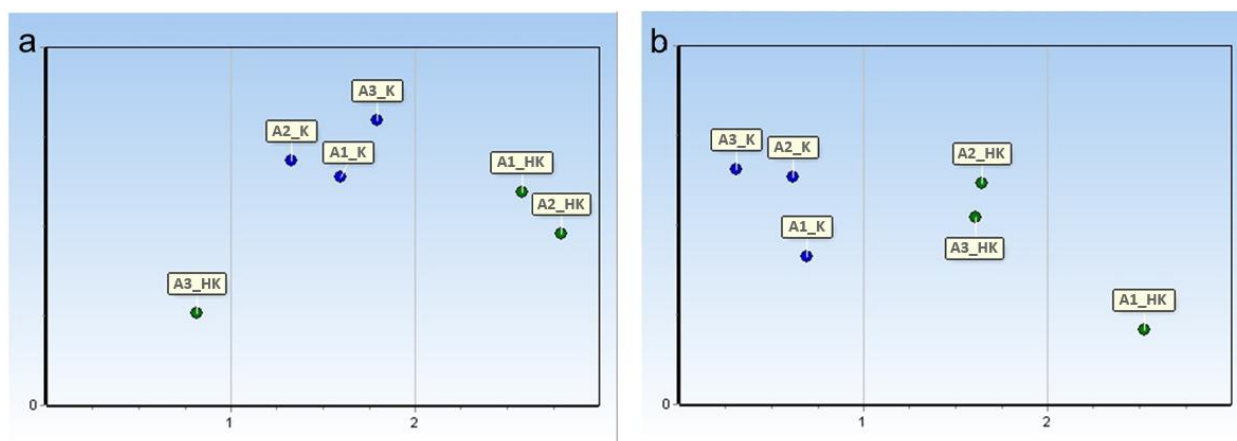
A vizsgált miRNS-ek közül a miR-191-5p expressziós szintje mind a hőkezelt ($p < 0,001$), mind a hősokknak kitett csoportban ($p < 0,001$) szignifikánsan csökkent a kontrollcsoporthoz viszonyítva (27a. ábra). Ezzel szemben a miR-378a-3p ($p = 0,013$) (27d. ábra) és a miR-138-5p ($p = 0,014$) (27e. ábra) esetében szignifikáns expresszióscsökkenés kizárólag a hőkezelésnek kitett csoportban volt megfigyelhető.



27. ábra. A vizsgált miRNS-ek relatív expressziós szintjei. (a) A miR-191-5p relatív expressziós szintje; (b) a miR-320a-3p relatív expressziós szintje; (c) a miR-372-3p relatív expressziós szintje; (d) a miR-378a-3p relatív expressziós szintje; (e) a miR-138-5p relatív expressziós szintje.

Az eredmények értékelésének kiegészítéseként Kohonen-féle önszerveződő térképet (Self-Organizing Map, SOM) alkalmaztunk a hasonló expressziós mintázatot mutató minták klasztereinek azonosítására, az expressziós hasonlóságok feltárását szolgáló vizualizációs módszerként. A 28. ábrán látható, hogy a kontrollminták minden esetben egy csoportba rendeződtek. Az „A” kísérletben a 28a. ábrán bemutatott markerek expressziójában a kezelések hatására bekövetkezett változások kimutathatók voltak, azonban a hőkezelés hatása az egyedi

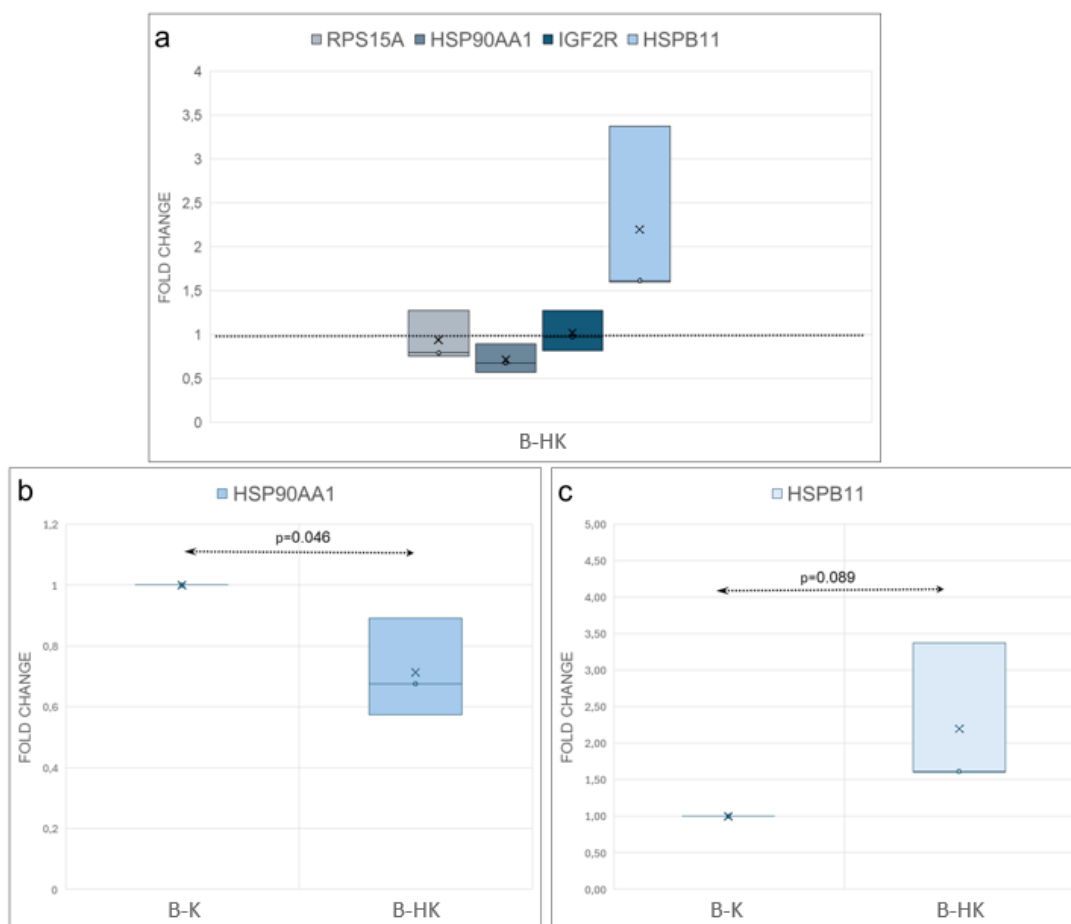
biológiai válaszok miatt nem különült el egyértelműen. A 28b. ábrán bemutatott miRNS-expressziós mintázatok esetében a kontrollminták egymáshoz viszonylag közel helyezkedtek el, míg a hőkezelt minták nagyobb variabilitást mutattak. Az A3_HK minta a kontrollmintákhoz közelebb helyezkedett el, míg az A1_HK és A2_HK minták azoktól elkülönültek. A hőkezelt minták ugyanakkor egymástól is eltérő pozíciót foglaltak el, ezért a hőkezeléshez kapcsolódó egységes klasztereződési mintázat nem volt megfigyelhető. A HS csoport adatait a statisztikai elemzés során figyelembe vettük, eredményeit azonban a biológiai ismétlések közötti nagyfokú variabilitás miatt nem jelenítettük meg az ábrán, mivel a csoportátlag nem tükrözte megfelelően az egyedi minták eredményeit.



28. ábra. Kohonen-féle klaszterezés a kezelési csoportok mRNS- (a) és miRNS- (b) expressziós profiljai alapján. A kontrollcsoportokat kék, a hőkezelt csoportokat zöld színnel jelöltük.

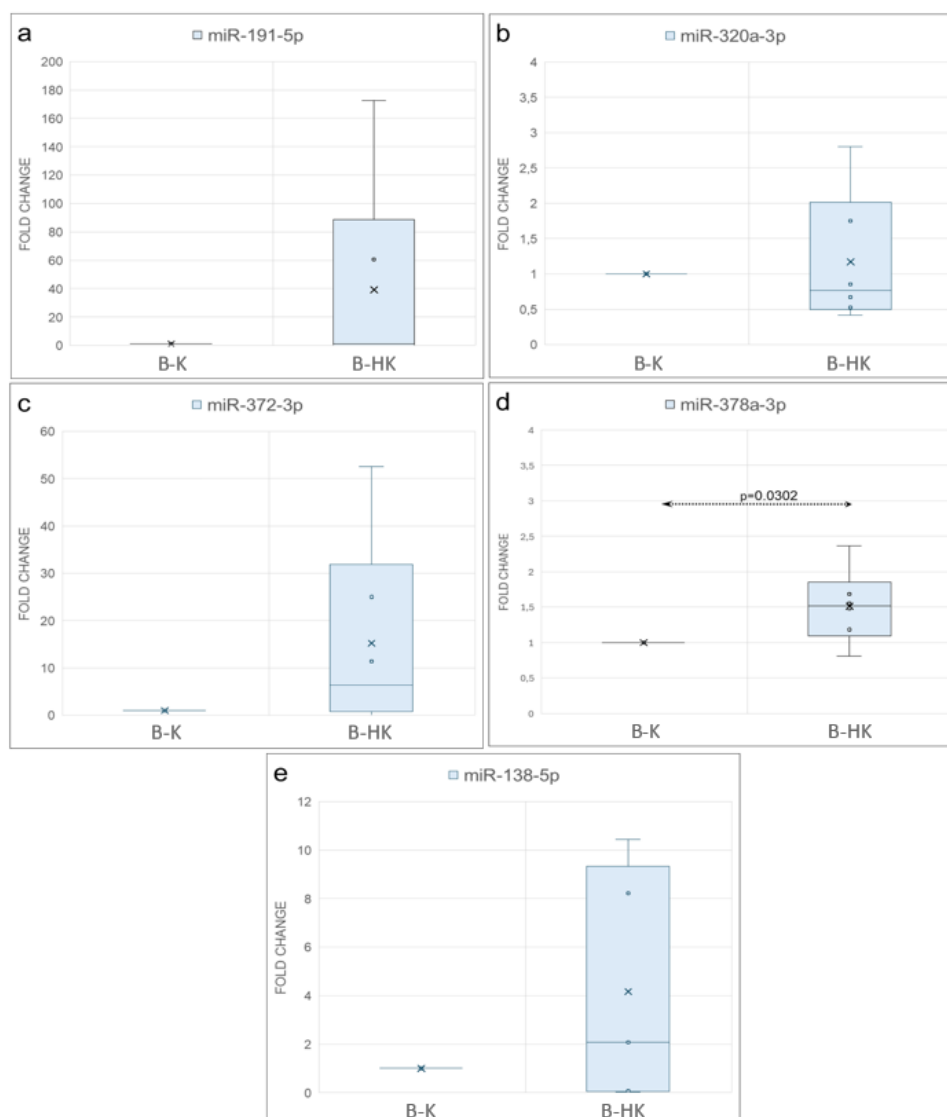
5.2.2. „B” kísérlet

A „B” kísérletben (B_K, B_HK) kizárólag hőkezelést alkalmaztunk, mivel a hősokknak kitett csoport nagyfokú variabilitást mutatott a biológiai ismétlések között. A vizsgált gének relatív expressziós szintjeit a 29. ábra mutatja be. Az expressziós értékeket az *EEF1A1* referenciagénhez normalizáltuk, a kontrollcsoport értékét 1-nek tekintve. A 29a. ábra alapján a *HSP90AA1* gén expressziós szintje hőkezelés hatására szignifikánsan csökkent ($p = 0,046$), míg a többi vizsgált marker expressziója a kontrollcsoportéhoz hasonló maradt. A *HSP90AA1* expressziójának csökkenése ezen kísérleti körülmények között is szignifikáns volt (29b. ábra), míg a *HSPB11* gén az „A” kísérlethez hasonló csökkenő tendenciát mutatott, azonban a jelentős egyedi variabilitás miatt ez a különbség nem érte el a statisztikai szignifikancia szintjét ($p = 0,089$) (29c. ábra).



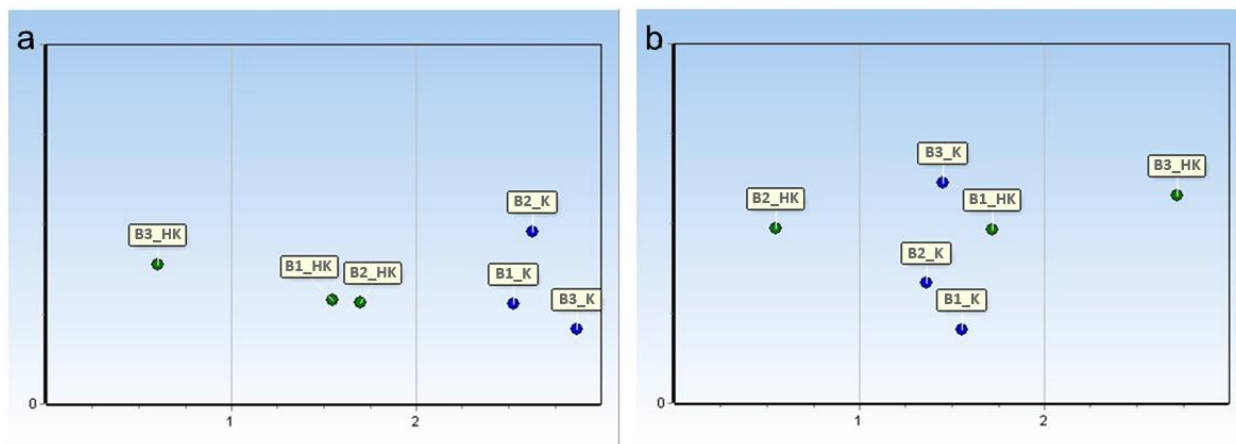
29. ábra. (a) A vizsgált gének relatív expressziós szintjei; (b) a *HSP90AA1* gén relatív expressziós szintje; (c) a *HSPB11* gén relatív expressziós szintje az embriók felolvasztását követően

A kísérletben a miRNS-expressziós profilok nagy variabilitást mutattak, még a hőkezelt csoporton belül is, ami összefügghetett a krioprezervációval. Ennek következtében a minták közötti szórásértékek is jelentősen megnövekedtek. Az expressziós szinteket a miR-92a-3p referencia-miRNS-hez normalizáltuk, a kontrollcsoport értéke 1 volt. A vizsgált miRNS-ek közül kizárólag a miR-378a-3p expressziója volt szignifikánsan magasabb a hőkezelt csoportban a kontrollcsoporthoz viszonyítva (30d. ábra; $p = 0,03$). Az „A” kísérletben szignifikáns változást mutató további miRNS-ek expressziója a „B” kísérletben nem különbözött szignifikánsan a két csoport között (30a., b., c., e. ábra).



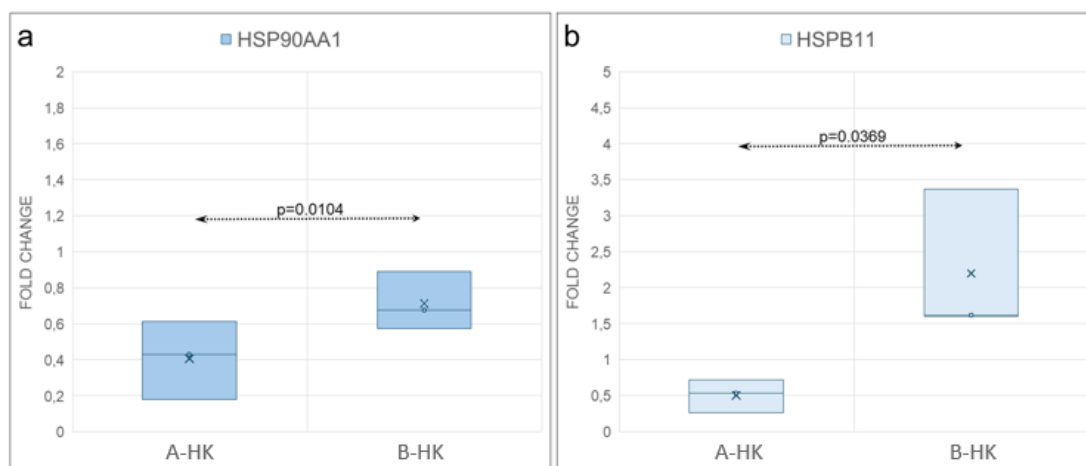
30. ábra. A vizsgált miRNS-ek relatív expressziós szintjei a „B” kísérletben. (a) miR-191-5p; (b) miR-320a-3p; (c) miR-372-3p; (d) miR-378a-3p; (e) miR-138-5p relatív expressziós szintje.

Az „A” kísérlethez hasonlóan a „B” kísérlet során is elvégeztük a Kohonen-féle klaszterezést. A kontrollcsoportokból származó minták mindkét markerkészlet esetében egy csoportba rendeződtek, amint az a 31. ábrán látható. A kezelt csoportok között mindkét esetben előfordult egy olyan csoport, amelyben a hőkezelés hatása nem volt egyértelműen kimutatható. A génmarkerek esetében ez a B2_HK csoport volt (31a. ábra), míg a miRNS-ek esetében a B1_HK csoport (31b. ábra) mutatott a kontrollmintákhoz hasonló expressziós mintázatot. A többi kezelt csoportban azonban a hőkezelés hatása egyértelműen megfigyelhető volt.



31. ábra. A „B” kísérlet két kezelési csoportjának Kohonen-féle klaszterezése az mRNS- (a) és miRNS- (b) expressziós profilok alapján. A kontrollcsoportokat kék, a hőkezelt csoportokat zöld szín jelöli.

Az „A” és „B” kísérlet hőkezelt (HK) csoportjaiban mért *HSP90AA1*- és *HSPB11*- expressziós szintek összehasonlítása során megfigyeltük, hogy a krioprezervációt követően mindkét marker expressziója emelkedett. Ez az emelkedés az „A” kísérlethez viszonyítva mind a *HSP90AA1* ($p = 0,01$), mind a *HSPB11* ($p = 0,036$) gén esetében statisztikailag szignifikánsnak bizonyult (32. ábra). Mivel azonban az adatok két különálló kísérletből származtak, közvetlen összehasonlíthatóságuk korlátozott, ezért a megfigyelt eltérés nem tulajdonítható egyértelműen kizárólag a krioprezerváció hatásának.



32. ábra. A *HSP90AA1* (a) és a *HSPB11* (b) gének expressziós szintje a hőkezelt (HK) csoportokban az „A” és „B” kísérlet során

5.2.3. „C” kísérlet

A „C” kísérletben (C_K, C_HK, C_KF, C_HKF) a hőkezelés hatását három hősokkfehérjét kódoló gén – a *HSP90AA1*, a *HSPA1A* és a *HSPB11* – expressziójának vizsgálatával értékeltük a tenyésztés 7. és 8. napján gyűjtött friss blasztocisztákban, valamint a krioprezervációt és

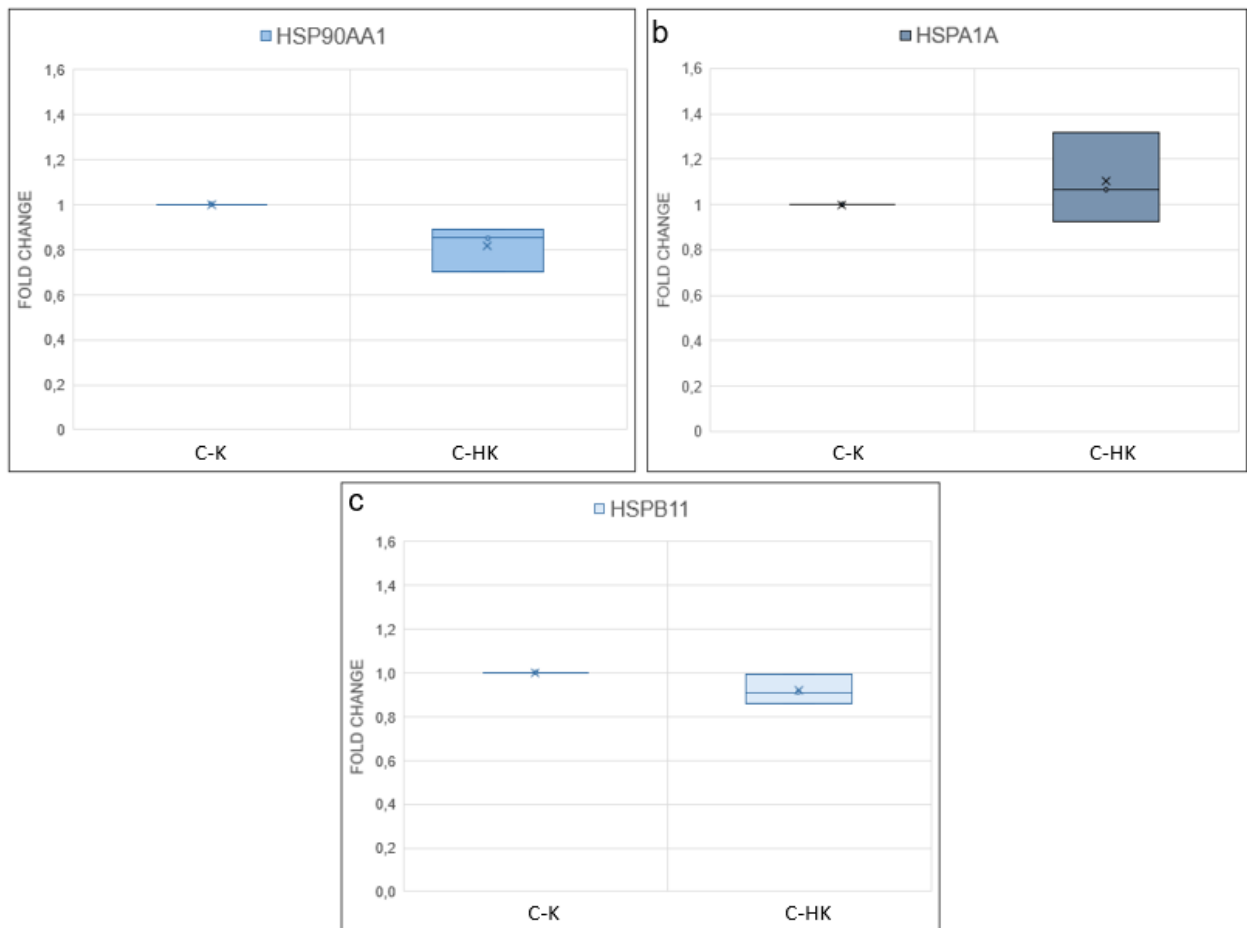
felolvasztást követően. Csoportonként 15 blasztocisztát poolozva dolgoztunk fel, három biológiai ismétlésben, mintánként három technikai párhuzamos reakcióval. A „C” kísérlet során a 7. napon vett minták génexpressziós analízisének eredményeit a 10. táblázatban foglaltam össze.

10. táblázat. A „C” kísérlet során elvégzett génexpressziós analízis összesített eredményei

Összehasonlítás	Gén	Fold change	p-érték	Értékelés
K D7 – HK D7	HSP90AA1	–1,23	0,051	tendencia
	HSPB11	–1,09	0,097	n.s.
	HSPA1A	+1,09	0,246	n.s.
KF – HKF	HSPA1A	+1,33	0,034	szignifikáns
	HSP90AA1	+1,13	0,253	n.s.
	HSPB11	+1,09	0,341	n.s.
K D7 – KF	HSPA1A	+4,33	0,006	szignifikáns
	HSPB11	+2,24	0,021	szignifikáns
	HSP90AA1	–1,13	0,059	tendencia
HK D7 – HKF	HSPA1A	+5,27	0,010	szignifikáns
	HSPB11	+2,67	0,035	szignifikáns
	HSP90AA1	+1,23	0,168	n.s.
K D7 – HKF	HSPA1A	+5,74	0,009	szignifikáns
	HSPB11	+2,45	0,051	tendencia
	HSP90AA1	+1,00	0,498	n.s.

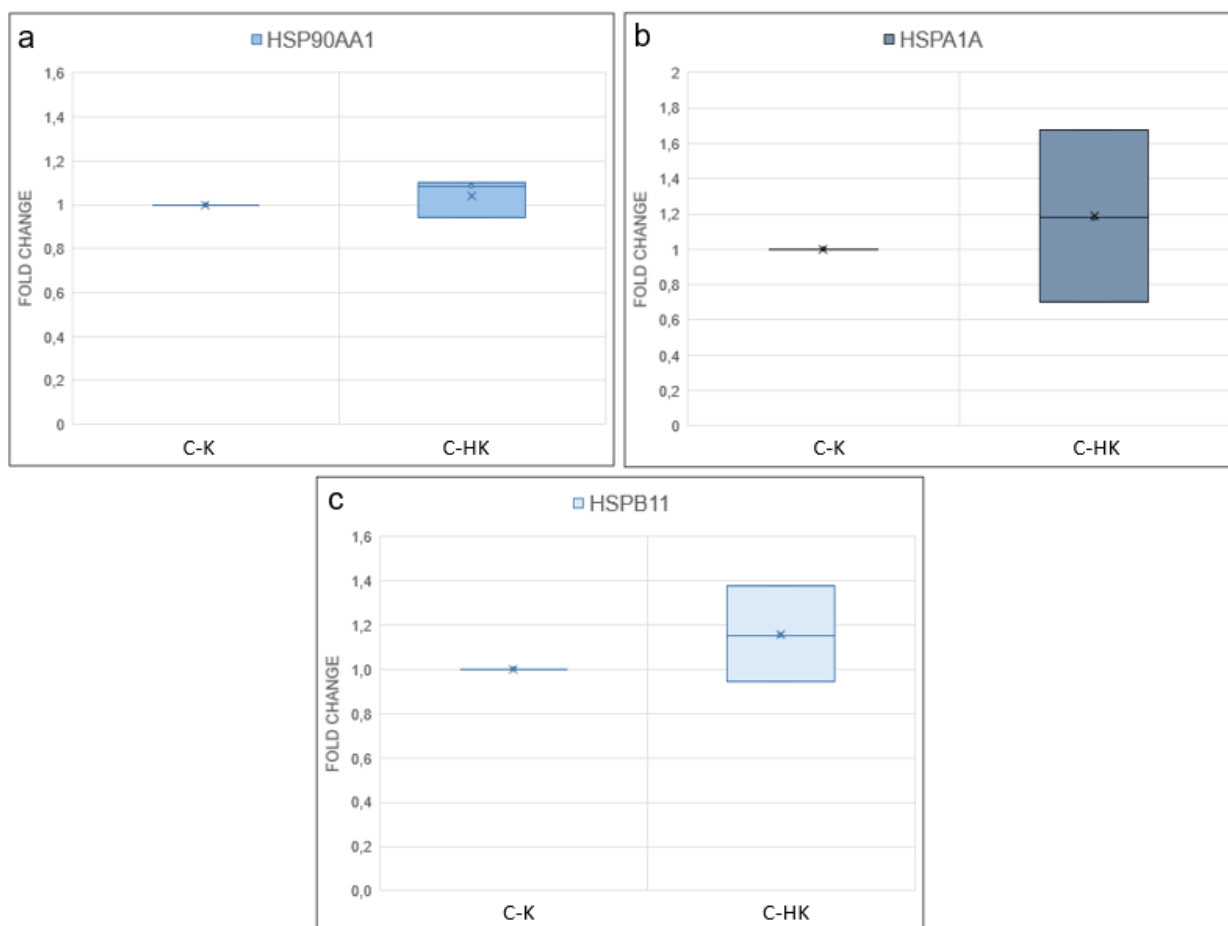
n.s. – nem szignifikáns

A tenyésztés 7. napján a *HSP90AA1* gén (33a. ábra) expressziója a hőkezelt csoportban alacsonyabb volt, mint a kontrollcsoportban (K: $0,0561 \pm 0,0026$ vs. HK: $0,0454 \pm 0,0009$; $2^{-\Delta Ct}$, átlag $\pm$ SEM), ami 1,23-szoros csökkenésnek felel meg. A különbség a szignifikancia határán mozgott ($p = 0,051$), ezért tendenciaként értékelhető. A *HSPB11* (33c. ábra) esetében szintén enyhe, nem szignifikáns csökkenés volt megfigyelhető ($0,000130 \pm 0,000010$ vs. $0,000119 \pm 0,000006$; $p = 0,097$), míg a *HSPA1A* expressziója (33b. ábra) gyakorlatilag változatlan maradt ($0,0091 \pm 0,0017$ vs. $0,0098 \pm 0,0017$; $p = 0,246$).



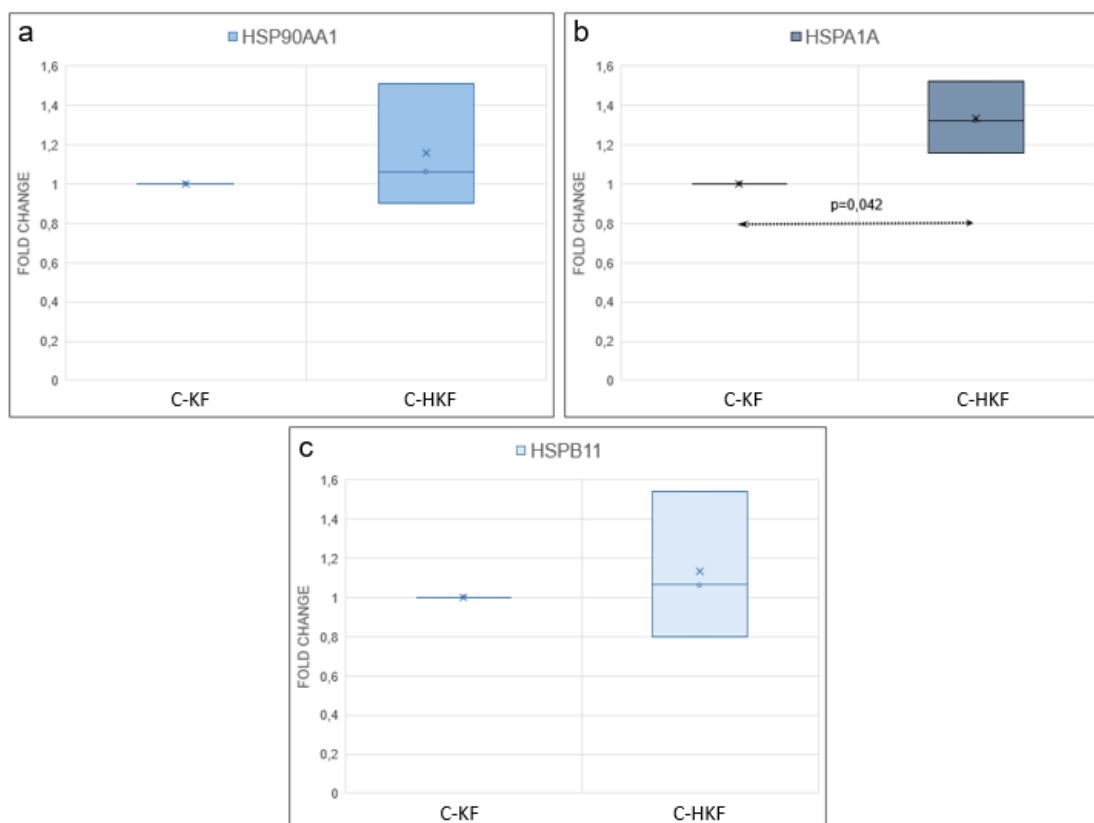
33. ábra. A *HSP90AA1* (a), *HSPA1A* (b) és a *HSPB11* (c) gének expressziós szintje az embriótenyésztés 7. napján gyűjtött mintákban a „C” kísérlet során

A tenyésztés 8. napjára a 7. napon megfigyelt tendencia kiegyenlítődött: egyik vizsgált gén esetében sem volt kimutatható eltérés a kontroll- és a hőkezelt csoport között (*HSP90AA1* (34a. ábra): $0,0458 \pm 0,0022$ vs. $0,0479 \pm 0,0039$; *HSPA1A* (34b. ábra): $0,0121 \pm 0,0019$ vs. $0,0129 \pm 0,0011$; *HSPB11* (34c. ábra): $0,000208 \pm 0,000023$ vs. $0,000232 \pm 0,000010$; valamennyi esetben $p > 0,05$). Ez arra utalhat, hogy a korai morula stádiumban alkalmazott hőkezelés transzkripció hatása átmeneti, és a blasztociszta-fejlődés előrehaladtával lecseng.



34. ábra. A *HSP90AA1* (a), *HSPA1A* (b) és a *HSPB11* (c) gének expressziós szintje az embriótenyésztés 8. napján gyűjtött mintákban a „C” kísérlet során

A krioprezervációt és felolvasztást követően ezzel szemben határozott eltérés mutatkozott a két csoport között: a *HSPA1A* expressziója (35b. ábra) szignifikánsan magasabb volt a hőkezelt csoportban, mint a kontrollcsoportban ($0,0373 \pm 0,0043$ vs. $0,0488 \pm 0,0029$; 1,33-szoros emelkedés; $p = 0,034$). A *HSP90AA1* (35a. ábra) ($0,0495 \pm 0,0010$ vs. $0,0570 \pm 0,0058$; $p = 0,253$) és a *HSPB11* (35c. ábra) ($0,000294 \pm 0,000033$ vs. $0,000328 \pm 0,000047$; $p = 0,341$) esetében hasonló irányú, de nem szignifikáns emelkedés volt megfigyelhető.



35. ábra. A *HSP90AA1* (a), *HSPA1A* (b) és a *HSPB11* (c) gének expressziós szintje az embriók felolvasztását követő 24. órában gyűjtött mintákban a „C” kísérlet során

A krioprezerváció önmagában is jelentős mértékben módosította a vizsgált gének expresszióját. A friss, 7. napi és a felolvasztott minták összehasonlítása alapján a kontrollcsoportban a *HSPA1A* expressziója 4,33-szorosára ($p = 0,006$), a *HSPB11* expressziója 2,24-szeresére ($p = 0,021$) emelkedett. A hőkezelt csoportban ugyanezek az emelkedések nagyobb mértékűek voltak: a *HSPA1A* esetében 5,27-szeres ($p = 0,010$), a *HSPB11* esetében 2,67-szeres ($p = 0,035$). A *HSP90AA1* expressziója egyik csoportban sem változott szignifikánsan a fagyasztás hatására (kontroll: $p = 0,059$; hőkezelt: $p = 0,168$).

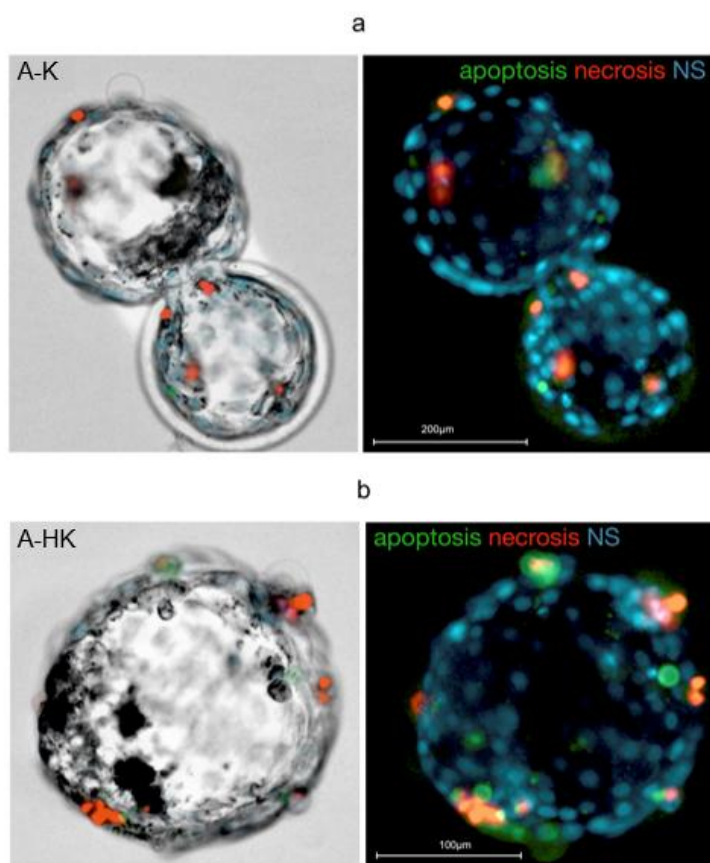
A két hatás együttes érvényesülését a friss kontroll- és a krioprezervált hőkezelt csoport összevetése szemlélteti: ebben az összehasonlításban a *HSPA1A* expressziója 5,74-szeresére emelkedett ($0,0091 \pm 0,0017$ vs. $0,0488 \pm 0,0029$; $p = 0,009$), a *HSPB11* esetében pedig 2,45-szörös, a szignifikancia határán lévő emelkedés volt megfigyelhető ($0,000130 \pm 0,000010$ vs. $0,000328 \pm 0,000047$; $p = 0,051$). A *HSP90AA1* expressziója ezzel szemben gyakorlatilag azonos maradt ($p = 0,498$).

Összességében a „C” kísérlet eredményei arra utalnak, hogy a korai morula stádiumban alkalmazott kontrollált hőkezelés a friss blasztocisztákban átmeneti, a 8. napra lecsengő transzkripciós változások tendenciájával járt együtt, a krioprezervációt követően azonban a hőkezelt embriók kifejezettebb *HSPA1A*-választ mutattak, mint a kontrollcsoport. Ez arra utalhat,

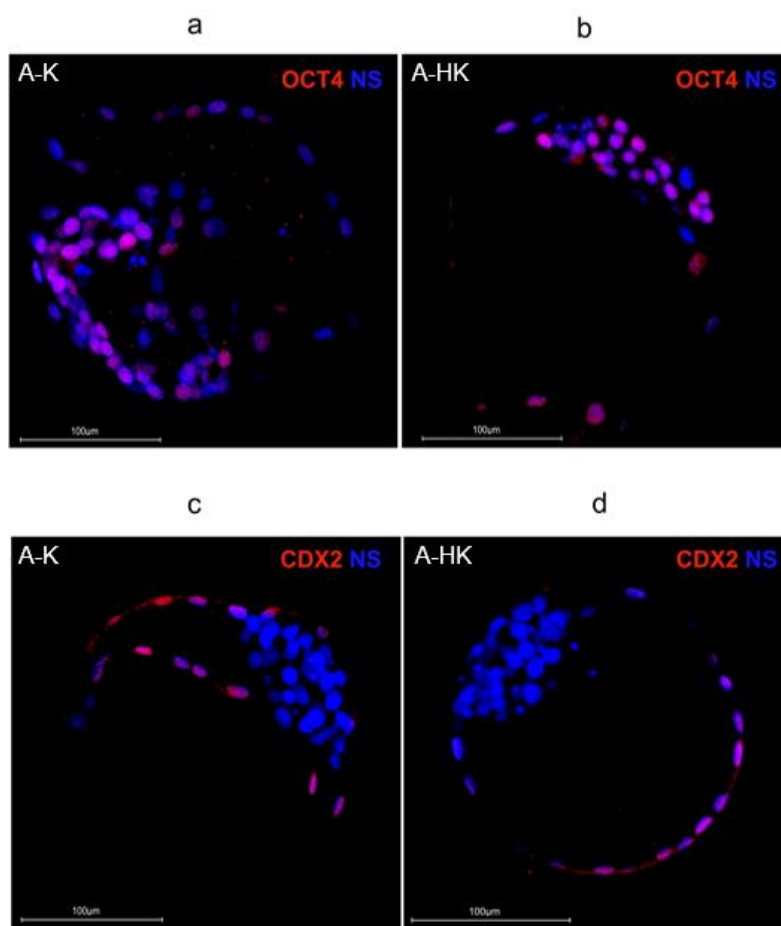
hogy az előzetes hőkezelés módosítja az embriók krioprezervációra adott molekuláris válaszát, ugyanakkor – mivel a fejlődési és túlélési mutatókban nem volt kimutatható különbség (5.1.3. fejezet) – ezek a változások önmagukban nem igazolják a kriotolerancia javulását.

5.3. Apoptózis-, nekrozis- és immunfluoreszcens festés

A kezelés hatásának szemléltetésére apoptózis- és nekrozisfestési (36. ábra), valamint immunfluoreszcens festési eljárást (37. ábra) alkalmaztunk az embriók morfológiájának és a vizsgált markerek lokalizációjának kvalitatív értékelése céljából. Az apoptózis- és nekrozisfestés alapján mind a kontroll, mind a hőkezelt csoportban életképes embriókat figyeltünk meg, és a két csoport között kvalitatív szempontból nem volt észlelhető számottevő különbség. Az immunfluoreszcens festés alapján valamennyi embrióban a CDX2 a trofektodermában lokalizálódott, míg az OCT4 expresszióját a belső sejttömegben mutattuk ki, tehát a vizsgált markerek lokalizációjában kvalitatív eltérés nem volt megfigyelhető a kontroll- és a hőkezelt csoport között.



36. ábra. A kontroll- (K) (a) és a hőkezelt (HK) (b) embriók apoptózis- és nekrozisfestése. A zöld szín az apoptotikus sejteket, a piros szín a nekrotikus sejteket, míg a kék szín a sejtmagokat jelöli.



37. ábra. Az OCT4 immunfluoreszcens festése kontroll- (K) (a) és hőkezelt (HK) (b) embriókban, valamint a CDX2 immunfluoreszcens festése kontroll- (c) és hőkezelt (d) embriókban. A piros fluoreszcencia a CDX2-pozitív sejteket, míg a kék fluoreszcencia az OCT4-pozitív sejteket jelöli.

6. KÖVETKEZTETÉSEK ÉS JAVASLATOK

A szarvasmarha-embriók a korai fejlődési szakaszokban különösen érzékenyek az emelkedett hőmérséklet hatásaira, mivel a környezeti stresszhatások ebben az időszakban jelentősen befolyásolhatják a sejtszintű és molekuláris folyamatokat (Shaleh *et al.*, 2026). Ennek megfelelően jelen vizsgálatban azt értékeltük, hogy a kontrollált hőkezelés miként befolyásolja az embriók fejlődését és stresszre adott válaszreakcióját.

Vizsgálatunkban egy kontrollált hőkezelési protokollt alkalmaztunk szarvasmarha embriókon, amelynek során a hőmérsékletet fokozatosan 38,8 °C-ról 40,0 °C-ra emeltük, a hőmérsékletet két órán át fenntartottuk, majd fokozatosan visszacsökkentettük 38,8 °C-ra annak érdekében, hogy megvizsgáljuk a kezelés embriókra gyakorolt hatását.

A hőkezelés optimális időpontjának megválasztásakor figyelembe vettük a szarvasmarha embriók hőérzékenységét a fejlődési stádium függvényében. Az embrionális genom aktivációját követően az embriók hőtűrése fokozatosan növekszik, így a morula stádiumú embriók lényegesen ellenállóbbak a hőstresszel szemben, mint a barázdálódás korábbi szakaszában lévő társaik (Sakatani, 2017). Ennek alapján a hőkezelést a korai morula stádiumban alkalmaztuk, mivel ez a fejlődési szakasz fokozott hőstressz-toleranciával, valamint hatékonyabb transzkripciós stresszválasz kialakításának képességével jellemezhető (Török *et al.*, 2012).

A hőstressz a szakirodalmi adatok alapján rendszerint csökkenti a blasztociszta stádiumig fejlődő embriók arányát (Amaral *et al.*, 2020; Kasimanickam–Kasimanickam, 2021). Vizsgálatunkban azonban, Oliveira és munkatársai (2021) megfigyeléseivel összhangban, a hőkezelés nem befolyásolta szignifikánsan a blasztociszták kialakulását. Eredményeink arra utalnak, hogy az alkalmazott hőkezelés enyhe stresszhatást idézett elő, és nem jelentett az embrionális fejlődés szempontjából súlyosan káros környezeti terhelést. Emellett a hőkezelés a fagyasztott embriók túlélési arányát sem csökkentette a felolvasztást követően. Eredményeink alapján feltételezhető, hogy a hőkezelt embriók a kombinált hő- és kriogén stresszhatás ellenére is megőrizték tovább fejlődési képességüket és fagyaszthatóságukat. A „C” kísérletben az embriók túlélési aránya a felolvasztást követő 24 órában valamennyi csoportban meghaladta a 90%-ot, a csoportok felében pedig elérte a 100%-ot, amely a korábbi, lassú fagyasztással végzett *in vitro* vizsgálatokban közölt értékekhez (66%) viszonyítva magasabbnak bizonyult (Arshad *et al.*, 2021; Inaba *et al.*, 2016). Ezek az eredmények a H1 hipotézist alátámasztják.

Korábbi vizsgálatokkal (Miętkiewska *et al.*, 2022; Sakatani *et al.*, 2013) ellentétben, amelyek a *HSP90AA1* expressziójának hőstresszt követő emelkedéséről vagy változatlanságáról számoltak be, jelen vizsgálatban az expressziós szint csökkenését figyeltük meg. A megfigyelt eltérés hátterében az embriók fejlődési stádiumában, a stresszhatás időtartamában, az embriók

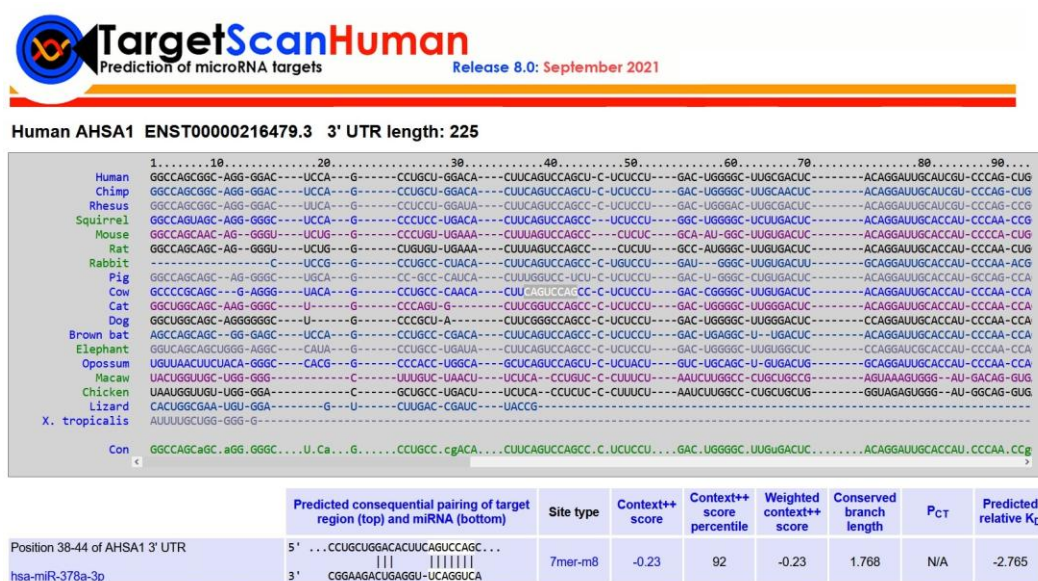
minőségében vagy az alkalmazott kísérleti feltételekben fennálló különbségek állhatnak. A hőkezelt, valamint a krioprezerváción átesett embriókban megfigyelt szignifikánsan alacsonyabb *HSP90AA1* expresszió arra utalhat, hogy az alkalmazott hőkezelés nem idézett elő olyan mértékű sejtszintű stresszt, amely a stresszválaszban részt vevő jelátviteli útvonalak fokozott aktivációját tette volna szükségessé. Ugyanakkor a *HSP90AA1* csökkent expressziójának funkcionális jelentősége jelen vizsgálat alapján nem határozható meg egyértelműen. Ismert, hogy a hősokkfehérjék a korai embrionális fejlődés során alapvető citoprotektív szerepet töltenek be: hozzájárulnak a fehérjék megfelelő térszerkezetének fenntartásához, a sejtes homeosztázis megőrzéséhez, valamint a genom stabilitásának biztosításához stresszkörülmények között. A *HSP90AA1* kiemelkedő jelentőségét támasztják alá Zhao és munkatársainak (2024) eredményei is, akik kísérletükben kimutatták, hogy a *HSP90AA1* gátlása szignifikánsan csökkenti az osztódott és a blasztociszta stádiumot elért embriók arányát, miközben növeli a fragmentáció mértékét és rontja a blasztociszták minőségét. Emellett a *HSP90AA1* gátlása az embriók összes sejtszámának, valamint a trofektoderma (TE) és a belső sejtöteg (ICM) sejtszámának csökkenéséhez vezetett, továbbá megváltoztatta a genom stabilitásával és a DNS-javító folyamatokkal összefüggő epigenetikai markereket. Annak ellenére, hogy jelen vizsgálatban a *HSP90AA1* expressziós szintjének csökkenését figyeltük meg, sem a blasztociszták kialakulása, sem az embriók felolvasztást követő túlélése nem romlott szignifikánsan. Mivel mind a hőstressz, mind a krioprezerváció általában oxidatív stresszel, fehérjedenaturációval, a citoszkeleton szerkezetének károsodásával, valamint DNS-károsodással jár együtt, a *HSP90AA1* csökkent expressziója arra utalhat, hogy az alkalmazott kísérleti körülmények között mérsékelt stresszválasz alakult ki. A *HSP90AA1* mellett a *HSPB11* expressziós szintje is szignifikánsan alacsonyabb volt az „A” kísérletben, míg a „B” kísérletben hasonló tendencia volt megfigyelhető, azonban ez a jelentős egyedi variabilitás miatt nem érte el a statisztikai szignifikancia szintjét. Bár a *HSPB11* pontos szerepe a szarvasmarha-embriók preimplantációs fejlődése során még nem teljesen ismert, korábbi vizsgálatok szerint citoprotektív funkciót tölthet be a mitokondriális membránok stabilizálása, valamint a HSP90- és PI3K–Akt-jelátviteli útvonalakhoz kapcsolódó sejt túlélési mechanizmusok aktiválása révén (Török *et al.*, 2012). A megfigyelt alacsonyabb *HSPB11*-expresszió ezért tovább erősítheti azt a feltételezést, hogy az alkalmazott kezelési körülmények nem váltottak ki súlyos sejtszintű stresszválaszt. Az „A” és „B” kísérletben a *HSP90AA1* és a *HSPB11* gének expressziója szignifikánsan magasabb volt a hőkezelt, majd krioprezervált embriókban, mint a kizárólag hőkezelésnek kitett embriókban; a nagyobb elemszámú „C” kísérletben ugyanezek a gének a felolvasztást követően nem különböztek szignifikánsan a két csoport között (*HSP90AA1*: $p = 0,253$; *HSPB11*: $p = 0,341$). Ez összefüggésbe hozható azzal, hogy a hőkezelés és a krioprezerváció együttes hatása erőteljesebb sejtszintű stresszválaszt váltott ki, mint a hőkezelés

önmagában. A tenyésztés 7. napján a *HSP90AA1* expressziója a hőkezelt csoportban csökkenő tendenciát mutatott ($p = 0,051$), a 8. napra azonban a tendencia kiegyenlítődött, ami arra utalhat, hogy a kontrollált hőkezelés transzkripció hatása átmeneti.

A vizsgálat során a *HSPA1A* expressziója kizárólag a hőkezelt és krioprezervált embriókban volt szignifikánsan magasabb, míg a mélyhűtés önmagában nem eredményezett szignifikáns változást. Ez arra utalhat, hogy a morula stádiumban alkalmazott kontrollált hőkezelés módosította az embriók későbbi molekuláris stresszválaszt, amely a krioprezervációt követően vált kimutathatóvá. Korábbi vizsgálatok szerint az enyhe hőkezelés a HSP70 család aktivációján keresztül sejtvédő folyamatokat indíthat el, amelyek hozzájárulhatnak a későbbi stresszhatásokkal szembeni adaptív válasz kialakulásához (Pustovaya *et al.*, 2026; Radons, 2016; Samali–Orrenius, 1998). A krioprezervációt követően a *HSPA1A* expressziója szignifikánsan magasabb volt a hőkezelt embriókban, mint a kizárólag krioprezervált kontrollcsoportban ($p = 0,034$), a friss kontrollcsoporthoz viszonyítva pedig 5,74-szeres emelkedést mutatott ($p = 0,009$). Mivel a *HSPA1A*-emelkedés mértéke a hőkezelt csoportban nagyobb volt (5,27-szeres), mint a kontrollcsoportban (4,33-szoros), az előzetes hőkezelés nem mérsékelte, hanem módosította a fagyasztásra adott molekuláris választ. Mindazonáltal a jelen vizsgálat eredményei önmagukban nem teszik lehetővé annak egyértelmű meghatározását, hogy a fokozott *HSPA1A* expresszió adaptív sejtvédő mechanizmust tükröz, vagy a hőkezelés és a krioprezerváció együttes hatására kialakuló fokozott sejtes stresszválasz következménye. A megfigyelt génexpressziós változások biológiai jelentőségének pontosabb értelmezéséhez további vizsgálatok szükségesek, amelyek kiterjednek a HSP70 fehérjeszintjének meghatározására, valamint annak funkcionális értékelésére, hogy a kontrollált hőkezelés fokozza-e a felolvasztott embriók egy későbbi hőstresszel szembeni toleranciáját. Emellett fontos vizsgálati szempont a kombinált hőkezelés és krioprezerváció hatására kialakuló adaptív molekuláris válaszok háttérében álló mechanizmusok tisztázása, mivel a kontrollált hőkezelés krioprezervációt megelőző alkalmazása által kiváltott stresszválaszhoz kapcsolódó molekuláris változások szarvasmarha-embriókban mindeddig csak korlátozottan ismertek. Tekintettel arra, hogy a fejlődési és túlélési mutatókban egyik kísérletben sem volt kimutatható különbség, ezek a molekuláris változások önmagukban nem igazolják a kriotolerancia javulását. Eredményeim ezzel a H2 és a H3 hipotézist egyaránt alátámasztják.

A miRNS-ek kulcsszerepet játszanak a génexpresszió poszttranszkripció szabályozásában. A hőkezelés által kiváltott molekuláris változások igazolása érdekében génexpressziós vizsgálatokat végeztünk olyan, a fejlődéssel és a stresszválasszal összefüggő markerek felhasználásával, amelyeket korábbi szakirodalmi adatok alapján választottunk ki (Sengar *et al.*, 2018; Yang *et al.*, 2025). Az alkalmazott hőkezelés egyik kísérletben sem befolyásolta a fejlődéshez kapcsolódó markerek expresszióját. Ezzel szemben a stresszel

összefüggő markerek expressziója hőkezelés során csökkent, míg hőstressz hatására szignifikáns mértékben emelkedett. A „B” kísérletben a krioprezerváció további stressztényezőként jelent meg, mivel a fagyasztást követően valamennyi vizsgált marker és miRNS expressziója emelkedett. A hőkezelés hatására szignifikáns expresszióváltozást mutató markerek közötti lehetséges kapcsolatokat ezt követően részletesebben is megvizsgáltuk. Feltételeztük, hogy ezek a markerek szabályozó jelátviteli útvonalakon keresztül hozzájárulhatnak a stressztűrő képesség javításához. A hipotézis vizsgálatára nyilvánosan elérhető adatbázisokat használtunk. A miRBase adatbázis (Kozomara *et al.*, 2019) elemzése alapján a jelen vizsgálatban szignifikáns expresszióváltozást mutató miR-378a-3p prediktált kötőhellyel rendelkezik az AHSA1 gén 3' nem transzlálódó régiójában (3' UTR), így feltételezhető, hogy szerepet játszik expressziójának szabályozásában. Az AHSA1 olyan segítő fehérje (co-chaperone), amely elősegíti és aktiválja a *HSP90AA1* működését (Agarwal *et al.*, 2015; McGeary *et al.*, 2019). A miRNS-célgenek előrejelzéséhez a TargetScan adatbázis legfrissebb verzióját (v8.0; targetscan.org) használtuk (38. ábra). A TargetScan egy szabadon hozzáférhető, széles körben alkalmazott adatbázis, amely a miRNS-ek célgénjeinek és feltételezett kötőhelyeinek előrejelzésére szolgál, ezáltal támogatja a mikroRNS-ek génexpresszió-szabályozásban betöltött szerepének vizsgálatát (Agarwal *et al.*, 2015; McGeary *et al.*, 2019).



38. ábra. A miR-378a-3p feltételezett kötőhelye a TargetScan adatbázis előrejelzése szerint (Agarwal *et al.*, 2015 és McGeary *et al.*, 2019 alapján).

Feltételezhető, hogy a miR-378a védő szerepet játszhat az embriók stresszhatásokra adott válaszában. A hőkezelést követően megfigyelt csökkent expresszió arra utalhat, hogy a fokozott adaptív képességgel rendelkező embriók esetében kisebb mértékű aktivációja szükséges a stresszhez kapcsolódó szabályozó mechanizmusoknak. Ezzel szemben a kombinált, hőkezelést

és kriogén stresszt követően megfigyelt emelkedett expresszió a sejtszintű stresszhatások ellensúlyozására irányuló kompenzációs mechanizmusok aktiválódását tükrözheti. Ezenkívül a hsa-miR-378a expressziója több daganattípusban – többek között húgyhólyagrákban (BLCA), emlőrákban (BRCA), vastagbél adenokarcinómában (COAD) és tüdő adenokarcinómában (LUAD) – csökkent, ami tumorszupresszor szerepére vagy e betegségek kialakulásában és progressziójában betöltött szerepére utalhat (Park *et al.*, 2022).

A krioprezervációt megelőző kontrollált hőkezelés által kiváltott molekuláris változások háttérében álló mechanizmusok részletesebb feltárásához további vizsgálatok szükségesek. Mivel a jelen vizsgálatban azonosított, stresszválaszhoz kapcsolódó miRNS-ek közül több szabályozó szerepe a szarvasmarha preimplantációs embrionális fejlődése során mindeddig nem ismert kellő részletességgel, a miRNS-ek által közvetített jelátviteli útvonalak, valamint a miRNS–mRNS kölcsönhatások további vizsgálata hozzájárulhat az embrionális stresszválasz molekuláris mechanizmusainak mélyebb megértéséhez.

Bár a jelen vizsgálatban kimutatott molekuláris változások nem jártak együtt a blasztocisztaképződés vagy a krioprezervációt követő túlélés javulásával, arra utalnak, hogy a kontrollált hőkezelés elegendő volt mérhető sejtszintű válaszok kiváltásához. A jövőbeni vizsgálatok során érdemes lehet megvizsgálni, hogy e megközelítés sejtes stressztűrést fokozó vegyületekkel – például coagulansin-A-val – történő kombinálása képes-e felerősíteni ezeket a molekuláris válaszokat, és ezáltal kedvezően befolyásolni az embriók hőstresszre adott válaszát, amint azt korábbi vizsgálatok is felvetették (Khan *et al.*, 2017).

Az apoptózis- és nekrozisfestés során a kontroll és a hőkezelt blasztociszták között kvalitatív értékelés alapján nem figyeltünk meg számottevő különbséget, ami arra utal, hogy a morula stádiumban alkalmazott kontrollált hőkezelés nem idézett elő olyan mértékű sejtkárosodást, amely a vizsgált módszerrel kimutatható lett volna. Ez összhangban áll Paula-Lopes és Hansen (2002) eredményeivel, akik megállapították, hogy az enyhe hőkezelés önmagában nem idézett elő fokozott apoptózist, ugyanakkor csökkentette a később alkalmazott intenzívebb hőstressz által kiváltott apoptotikus választ. Eredményeik alapján az enyhe hőkezelés előkondicionáló hatást fejthet ki, amely mérsékelheti a későbbi stresszhatások sejtkárosító következményeit.

A CDX2 a trofektoderma differenciálódásának meghatározó markere, míg az OCT4 elsősorban a belső sejtöteg pluripotens sejtjeiben expresszálódik (Aguila *et al.*, 2022). A vizsgálatunk során megfigyelt immunfluoreszcens lokalizáció megfelelt ennek a sejtvonalspecifikus expressziós mintázatnak. Megfigyeléseink arra utalnak, hogy a hőkezelés nem befolyásolta a blasztociszta sejtvonalaik differenciálódását és térbeli szerveződését, illetve nem

idézett elő olyan fejlődési rendellenességet, amely a trofektoderma és a belső sejttömeg elkülönülésének zavarára utalna.

Eredményeim értelmezésekor több módszertani korlátot is figyelembe kell venni. A vizsgálat kizárólag *in vitro* körülmények között zajlott, így a hőkezelés *in vivo* fejlődési és vemhesülési eredményeiről nem ad felvilágosítást. Emellett a sejtszintű vizsgálatok (apoptózis- és nekrozisfestés, immunfestés) kvalitatív értékelésen alapultak, ami a kisebb mértékű különbségek kimutatását nem tette lehetővé.

Az utóbbi évek kutatásai rámutattak arra, hogy a reprodukciós traktus különböző anatómiai szakaszai között fiziológiás körülmények esetén is hőmérsékleti gradiens figyelhető meg (López-Gatius és Hunter, 2020). El-Sheikh és munkatársai (2013) kimutatták, hogy a hőmérséklet a hüvelytől a méh felé fokozatosan emelkedik, a hüvely, a cervix, a méhtest és a méhszarvak között jelentős eltérések figyelhetők meg. Termoneutrális zónában az állatok vaginális hőmérséklete átlagosan 38,5–38,8 °C között alakul, enyhe hőstressz esetén 39 °C körüli értékre emelkedhet, míg súlyos hőstresszes állapot esetén elérheti a 39,5–40 °C-ot is (Vitali *et al.*, 2023). Tekintettel arra, hogy a blasztocisza ebben a fejlődési stádiumban már a méhszarvban helyezkedik el, a rendelkezésre álló szakirodalmi adatok (El-Sheikh *et al.*, 2013; Lees *et al.*, 2018b; López-Gatius–Hunter, 2020; Vitali *et al.*, 2023) felhasználásával megbecsültük az itt várható hőmérsékleti viszonyokat hőstresszes körülmények között. Ez szolgált alapul a vizsgálatban alkalmazott tenyésztési hőmérsékletek meghatározásához. Ennek megfelelően a kísérlet célja nem egy akut, extrém hősokk modellezése volt, hanem egy fiziológiás szempontból releváns, hőstressz során kialakuló hőterhelés vizsgálata.

A prolongált tenyésztés során az embriók túlélése a tenyésztési idő előrehaladtával fokozatosan csökkent, ami megerősíti, hogy a 8 napot meghaladó hosszú távú tenyésztés jelentős kihívást jelent az embriók életképességének fenntartásában (Martínez de Los Reyes *et al.*, 2026). Vizsgálatunkban ugyanakkor sikeresen kialakítottunk egy olyan tenyésztési rendszert, amely lehetővé tette friss és krioprezervált *in vitro* előállított szarvasmarha embriók életképességének nyomon követését az embriótenyésztés 14. napjáig. Az eredmények alapján sem a morula stádiumban alkalmazott kontrollált hőkezelés, sem a krioprezerváció, sem az alkalmazott tenyésztési hőmérsékletek nem befolyásolták szignifikánsan az embriók túlélését a hosszú távú tenyésztés során. A hőkezelés és a tenyésztési hőmérséklet, illetve a hőkezelés és a krioprezerváció közötti interakciók hiánya arra utal, hogy az alkalmazott hőkezelési protokoll nem biztosított kimutatható adaptív választ sem emelt hőmérsékleten történő hosszú távú tenyésztés, sem a krioprezervációt követő életképesség fenntartása során. Bár egyes kezelési kombinációkban magasabb túlélési arány volt megfigyelhető a hőkezelt embriók esetében, ezek a különbségek nem bizonyultak következetesnek, és statisztikailag nem voltak igazolhatók.

Eredményeink összhangban állnak a szakirodalomban leírtakkal, miszerint a blasztociszta stádiumú embriók fokozott hőtoleranciával rendelkeznek a korábbi fejlődési stádiumokhoz képest (Lima *et al.*, 2013; Naranjo-Gómez *et al.*, 2021; Sakatani, 2017; Shaleh *et al.*, 2026). A morula stádiumban alkalmazott kontrollált hőkezelés ugyanis nem befolyásolta szignifikánsan a későbbi blasztociszták túlélését sem prolongált tenyésztés, sem krioprezerváció után. Emellett a magasabb tenyésztési hőmérsékletek alkalmazása sem eredményezett a kontrollcsoporthoz viszonyítva számottevő embrióvesztést. A felolvasztást követő 24 órában megfigyelt túlélési arány jelen kísérletben is meghaladta a szakirodalomban lassú fagyasztást követően általában közölt 24 órás reexpandíós arányokat (Arshad *et al.*, 2021). Do és munkatársai (2017) a felolvasztást követő 48 órás tenyésztés után 66%-os kikelési arányról számoltak be. Mivel a jelen vizsgálatban a fagyasztott embriók között már kikelt blasztociszták is szerepeltek, a felolvasztást követő fejlődés értékelésére nem a kikelési arányt, hanem az embriók morfológiájának megfigyelését alkalmaztuk. Ennek megfelelően a túlélési arány a különböző kezelési csoportokban 79,3% és 96,7% között alakult, az összes csoport átlagát tekintve pedig 90,1% volt.

Vizsgálatunk eredményei részben eltérnek Mori és munkatársai (2015) megfigyeléseitől, akik *in vitro* előállított, felolvasztott blasztocisztákon vizsgálták a hősokk hatását. Vizsgálatukban a felolvasztást követően alkalmazott, 41 °C-on végzett 6 órás hőkezelés jelentősen csökkentette a kikelt blasztociszták arányát, átmérőjét, valamint az embriók minőségét, ezért arra a következtetésre jutottak, hogy a krioprezerváció és az azt követő hősokk együttes alkalmazása az embriók életképességét hátrányosan befolyásolja. Ezzel szemben a jelen vizsgálatban nem tapasztaltunk szignifikáns csökkenést a prolongált tenyésztés során megfigyelt túlélésben a krioprezervált, magasabb hőmérsékleten tenyésztett embriók esetében sem. A megfigyelt eltérések hátterében feltehetően a két vizsgálatban alkalmazott kísérleti körülmények közötti különbségek állnak. Mori és munkatársai 41 °C-on alkalmaztak 6 órás hősokkot, míg a jelen vizsgálatban az embriók legmagasabb tenyésztési hőmérséklete 39,5 °C volt, amely közelebb áll a fiziológiás hőstresszhez. Feltételezhető, hogy az alkalmazott mérsékelt hőterhelés nem váltott ki olyan mértékű sejtkárosodást, amely a későbbi embriófejlődés során kimutatható különbségeket eredményezett volna.

Tudomásunk szerint ez az első olyan vizsgálat, amelyben a kontroll és hőkezelt, valamint a friss és krioprezervált *in vitro* előállított embriók prolongált tenyésztését három különböző tenyésztési hőmérsékleten, egységes kísérleti elrendezésben hasonlítottuk össze. Bár korábbi közlemények beszámoltak felolvasztott embriók hosszú távú *in vitro* tenyésztéséről, azok a fejlődést legfeljebb az embriótenyésztés 12. napjáig követték nyomon (Nicacio *et al.*, 2012), míg jelen vizsgálatban az embriók életképességét a 14. napig értékeltük.

Vizsgálatunk elsődleges célja az embriók túlélésének meghatározása volt, ezért a késői fejlődési eseményeket, így például az embriódiszk kialakulását nem vizsgáltuk. Mivel azonban a prolongált tenyésztési rendszer alkalmasnak bizonyult az embriók életképességének fenntartására a tenyésztés 14. napjáig, megfelelő alapot biztosíthat olyan jövőbeli vizsgálatokhoz, amelyek a késői embrionális fejlődést, valamint az ezt meghatározó morfológiai és molekuláris változásokat is értékelik.

Összességében a vizsgált hőkezelési protokoll nem eredményezett kimutatható termotolerancia-növekedést a prolongált tenyésztés során, ezért a kísérlet eredményei nem támasztják alá a H4 hipotézist. Ugyanakkor a kialakított kísérleti modell új lehetőséget biztosít a szarvasmarha embriók zona pellucidából való kikelése utáni fejlődésének vizsgálatára. A modell egyúttal megfelelő kísérleti rendszert kínál különböző intenzitású hőstressz-kezelések hosszú távú fejlődésbiológiai hatásainak értékelésére is, ezáltal hozzájárulhat az embriók későbbi fejlődését és életképességét meghatározó mechanizmusok részletesebb feltárásához.

7. ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK

Vizsgálataim során egy integrált kísérleti rendszert alkalmaztam a korai morula stádiumban végzett kontrollált hőkezelés *in vitro* előállított szarvasmarha embriókra gyakorolt hatásának komplex értékelésére. Az egymásra épülő kísérletek lehetővé tették a hőkezelés fejlődésbiológiai, molekuláris, sejtszintű és kriobiológiai hatásainak, valamint a krioprezervációt követő hosszú távú életképesség prolongált embriótenyésztés során történő egységes vizsgálatát. Az eredmények alapján az alábbi új tudományos eredményeket fogalmaztam meg.

1. Igazoltam, hogy a korai morula állapotban alkalmazott kontrollált hőkezelés mRNS- és miRNS-szintű változásokat idéz elő az *in vitro* előállított szarvasmarha-embriókban anélkül, hogy szignifikánsan rontaná azok fejlődési potenciálját vagy a krioprezervációt követő túlélését. Eredményeim alapján megállapítható, hogy a vizsgált molekuláris markerek érzékenyebb indikátorai a kontrollált hőterhelés következtében létrejött változásoknak, mint a vizsgált fejlődésbiológiai paraméterek.
2. A kontrollált hőkezeléshez kapcsolódó specifikus miRNS-expressziós változásokat azonosítottam szarvasmarha-embriókban. A miR-191-5p expressziója mind a kontrollált hőkezelés, mind a hősokk hatására szignifikánsan csökkent, míg a miR-378a-3p és a miR-138-5p expressziójának szignifikáns csökkenése kizárólag a kontrollált hőkezelést követően volt kimutatható. Krioprezerváció után a vizsgált miRNS-ek közül egyedül a miR-378a-3p expressziója változott szignifikánsan, ami e miRNS kombinált stresszhatásokra adott válaszban betöltött lehetséges szerepére utal.
3. Igazoltam, hogy a krioprezerváció szelektív, chaperonspecifikus hősokkfehérje-választ indukál szarvasmarha-embriókban. A HSPA1A és a HSPB11 expressziója mind a kontroll-, mind az előzetesen hőkezelt embriókban szignifikánsan emelkedett, míg a HSP90AA1 expressziója nem változott szignifikánsan. Az előzetesen kontrollált hőkezelésnek kitett embriókban a felolvasztást követő HSPA1A-expresszió szignifikánsan magasabb volt, mint a kizárólag krioprezervált kontrollcsoportban, ami arra utal, hogy az előzetes hőkezelés módosítja a krioprezervációra adott molekuláris stresszválaszt.

4. Sikeresen adaptáltam szarvasmarha-embriók esetében a prolongált in vitro tenyésztési rendszert. Kimutattam, hogy sem a tenyésztési hőmérséklet, sem a kontrollált hőkezelés, sem a krioprezerváció nem befolyásolta szignifikánsan az embriók túlélését, és a vizsgált tényezők közötti kölcsönhatások sem bizonyultak szignifikánsnak.
5. Kvalitatív sejtszintű vizsgálatokkal kimutattam, hogy a kontrollált hőkezelési protokoll alkalmazását követően a vizsgált módszerekkel nem volt azonosítható eltérés a korai embrió-specifikus markerek expressziójában, és a kontrollcsoporthoz képest fokozott sejtkárosodás sem volt megfigyelhető a szarvasmarha-embriókban.

8. ÖSSZEFOGLALÁS

A hőstressz a szarvasmarha-tenyésztés egyik legjelentősebb környezeti kihívása, amely kedvezőtlenül befolyásolja a reprodukciós teljesítményt, valamint az *in vitro* embrió-előállítás (IVEP) eredményességét. A preimplantációs embriók hőérzékenysége fejlődési stádiumonként jelentősen eltér, ugyanakkor a korai morula stádiumban alkalmazott enyhe, kontrollált hőkezelés hosszú távú molekuláris és fejlődésbiológiai következményei, valamint a krioprezervációra gyakorolt hatásai mindeddig csak részben ismertek. Disszertációm célja ezért a korai morula stádiumban alkalmazott kontrollált hőkezelés *in vitro* előállított szarvasmarha embriókra gyakorolt fejlődésbiológiai, molekuláris, sejtszintű és kriobiológiai hatásainak komplex vizsgálata volt. A disszertáció négy egymásra épülő kísérlet eredményeit foglalja össze, amelyek integrált megközelítésben tették lehetővé a kontrollált hőkezelés közvetlen és hosszú távú hatásainak értékelését.

Az *in vitro* előállított embriókon a termékenyítést követő 116. órában kontrollált hőkezelést (HK) alkalmaztam, amelynek során a hőmérsékletet 38,8 °C-ról fokozatosan 40,0 °C-ra emeltem, ezt a hőmérsékletet két órán át fenntartottam, majd fokozatosan csökkentettem 38,8 °C-ra. Pozitív stresszkontrollként akut hősokk-kezelést (HS) alkalmaztam, amely során az embriókat közvetlenül 40,0 °C-os hőmérsékletnek tettem ki két órán keresztül. A blasztociszta-képződés, valamint a lassú fagyasztást követő túlélés alakulását általánosított lineáris vegyes modellek segítségével értékeltük. A stresszválaszhoz és az embrionális fejlődéshez kapcsolódó gének, valamint mikroRNS-ek expresszióját RT-qPCR módszerrel határoztuk meg, referenciagénként pedig a NormFinder algoritmus alapján kiválasztott *EEF1A1* gént és miR-92a-3p miRNS-t alkalmaztuk. Az apoptózis és nekrozis jelenlétét fluoreszcens festéssel kvalitatívan értékeltük, míg a sejtvonal-specifikus CDX2 és OCT4 markerek expresszióját immunfluoreszcens festéssel vizsgáltuk. A „D” kísérlet keretében hosszú távú *in vitro* embriótenyésztési rendszert alkalmaztam, amelyben a kontroll- és hőkezelt, valamint a friss és krioprezervált embriók életképességét három különböző tenyésztési hőmérsékleten értékeltem az embriófejlődés 14. napjáig.

A kontrollált hőkezelés sem a blasztociszta-arányokat, sem a felolvasztást követő túlélést nem befolyásolta szignifikánsan, ami arra utal, hogy az alkalmazott hőterhelés nem volt olyan mértékű, hogy az embriók fejlődési képességében vagy kriotoleranciájában kimutatható csökkenést idézzon elő. Molekuláris szinten a kontrollált hőkezelés a friss blasztocisztákban szignifikánsan csökkentette a *HSP90AA1* és a *HSPB11* expresszióját, míg a krioprezerváció a stresszválaszhoz kapcsolódó gének fokozott expressziójával járt. A hőkezelés és a krioprezerváció együttes hatására sajátos génexpressziós mintázat alakult ki, amelynek részeként a *HSPA1A* expressziója szignifikánsan magasabb volt a hőkezelt, krioprezervált embriókban, mint a friss

kontrollcsoportban. A mikroRNS-ek közül a miR-191-5p expressziója mind a kontrollált hőkezelést (HK), mind az akut hősokkot (HS) követően szignifikánsan csökkent, míg a miR-378a-3p és a miR-138-5p esetében kizárólag a kontrollált hőkezelés hatására volt kimutatható szignifikáns expresszió csökkenés. A krioprezervációt követően a hőkezelt embriókban a vizsgált miRNS-ek közül kizárólag a miR-378a-3p expressziója változott szignifikánsan, ami ezen miRNS lehetséges szerepére utalhat a hőterhelés és a krioprezerváció együttes hatására kialakuló molekuláris válaszban.

Az apoptózis- és nekrozisfestés, valamint a CDX2 és OCT4 markerek immunfluoreszcens vizsgálatának kvalitatív értékelése alapján nem mutatkozott egyértelmű eltérés a kontroll- és a hőkezelt embriók között.

A prolongált tenyésztés során az embriók túlélési aránya a tenyésztési idő előrehaladtával fokozatosan csökkent, míg a tenyésztési hőmérséklet, az előzetes hőkezelés és a krioprezerváció túlélésre gyakorolt hatása nem bizonyult szignifikánsnak. A kontrollált hőkezelés az emelt tenyésztési hőmérsékleten, illetve a krioprezervációt követően sem javította kimutatható mértékben az embriók hosszú távú túlélését, ami arra utal, hogy az alkalmazott kezelési protokoll a vizsgált körülmények között nem eredményezett kimutatható termotolerancia-növekedést. Mindazonáltal a kialakított prolongált tenyésztési rendszer lehetővé tette az embriók életképességének nyomon követését a tenyésztés 14. napjáig, és megfelelő kísérleti modellt biztosíthat a hőterhelés későbbi embrionális fejlődésre gyakorolt hatásainak vizsgálatához.

Eredményeink összességében azt mutatják, hogy a korai morula stádiumban alkalmazott kontrollált hőkezelés kimutatható molekuláris változásokat idézett elő anélkül, hogy kedvezőtlenül befolyásolta volna az embriók fejlődését vagy kriotoleranciáját. Ez arra utal, hogy enyhe hőterhelés esetén a molekuláris markerek érzékenyebben jelezhetik a hőkezelés hatását, mint a vizsgált embriófejlődési paraméterek. A vizsgálat eredményei hozzájárulhatnak a hőterhelésre és a krioprezervációra adott embrionális válaszok hátterében álló molekuláris folyamatok pontosabb megértéséhez, valamint alapot biztosíthatnak az embrió-előállítási és krioprezervációs eljárások további optimalizálásához a szarvasmarha-tenyésztést érintő, egyre kedvezőtlenebb környezeti feltételek mellett.

9. SUMMARY

Heat stress is one of the most significant environmental challenges in cattle production, adversely affecting reproductive performance and the efficiency of *in vitro* embryo production (IVEP). The heat sensitivity of preimplantation embryos is strongly stage-dependent; however, the long-term molecular and developmental consequences of a mild, controlled heat treatment applied at the early morula stage, together with its effects on cryopreservation, remain only partially understood. The aim of this dissertation was therefore a comprehensive evaluation of the developmental, molecular, cellular and cryobiological effects of controlled heat treatment (HT) applied at the early morula stage in *in vitro*-produced bovine embryos. The work integrates four consecutive experiments (A–D) designed to assess both the immediate and the long-term consequences of controlled heat exposure.

In vitro-produced embryos were exposed at 116 h post-insemination to a gradual increase in temperature from 38.8 °C to 40.0 °C, a 2 h plateau, and a return to 38.8 °C (HT); an acute heat-shock group (HS; direct exposure to 40.0 °C for 2 h) served as a positive stress control. Blastocyst formation and post-thaw survival after slow freezing were analysed using generalized linear mixed models. The expression of stress- and development-associated genes and microRNAs was quantified by RT-qPCR, with *EEF1A1* and miR-92a-3p selected as reference genes by the NormFinder algorithm. Apoptosis and necrosis, together with the lineage markers CDX2 and OCT4, were assessed by fluorescence and immunofluorescence staining. In addition, a prolonged *in vitro* culture model (Experiment D) compared control and heat-treated, fresh and cryopreserved embryos at three culture temperatures up to Day 14 of development.

Controlled heat treatment did not significantly affect blastocyst formation or post-thaw survival, indicating that the applied thermal exposure represented a mild rather than a severely detrimental stress. At the molecular level, HT significantly reduced the expression of *HSP90AA1* and *HSPB11* in fresh blastocysts, whereas cryopreservation increased the expression of stress-associated markers; the combination of heat treatment and cryopreservation elicited a distinct response, with significantly higher *HSPA1A* expression in heat-treated cryopreserved embryos than in fresh controls. Among the microRNAs, miR-191-5p was significantly downregulated after both HT and HS, whereas miR-378a-3p and miR-138-5p decreased significantly only after HT; following cryopreservation, only miR-378a-3p showed a significant change in heat-treated embryos, suggesting potential involvement in the response to combined thermal and cryopreservation stress.

Apoptosis/necrosis staining and CDX2/OCT4 immunolocalization revealed no apparent qualitative differences between the control and heat-treated groups.

During prolonged culture, embryo survival progressively declined from Day 10 to Day 14, whereas culture temperature, prior heat treatment and cryopreservation had no significant overall effect on survival. Controlled heat treatment did not confer a detectable long-term survival advantage at elevated culture temperatures or following cryopreservation, indicating that the applied treatment did not induce measurable thermotolerance under the examined conditions. Nevertheless, the prolonged culture system allowed embryo viability to be monitored up to Day 14 and provides a model for investigating later developmental responses to thermal stress.

Taken together, the results demonstrate that controlled heat treatment at the early morula stage induces measurable molecular changes without compromising developmental competence or cryosurvival, and indicate that molecular markers may be more sensitive indicators of mild thermal exposure than the examined developmental parameters. These findings contribute to a better understanding of the molecular mechanisms underlying embryonic responses to thermal and cryogenic stress and may support the future optimization of embryo production and cryopreservation strategies in cattle breeding under increasingly challenging environmental conditions.

10. IRODALOMJEGYZÉK

- Abe H., Yamashita S., Satoh T., Hoshi H. (2002) Accumulation of cytoplasmic lipid droplets in bovine embryos and cryotolerance of embryos developed in different culture systems using serum-free or serum-containing media. *Mol. Reprod. Dev.* 61(1):57–66. <https://doi.org/10.1002/mrd.1131>
- Abraham M.C., Ruete A., Brandt Y.C.B. (2010) 260 Breed Influences Outcome of *in vitro* Production of Embryos in Cattle. *Reprod. Fertil. Dev.* 22(1):287. <https://doi.org/10.1071/RDv22n1Ab260>
- Agarwal V., Bell G.W., Nam J.W., Bartel D.P. (2015) Predicting effective microRNA target sites in mammalian mRNAs. *eLife* 4:e05005. <https://doi.org/10.7554/eLife.05005>
- Aguiar L.H., Hyde K.A., Pedroza G.H., Denicol A.C. (2020) Heat stress impairs *in vitro* development of preantral follicles of cattle. *Anim. Reprod. Sci.* 213:106277. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2020.106277>
- Aguila L., Osycka-Salut C., Treulen F., Felmer R. (2022) Pluripotent Core in Bovine Embryos: A Review. *Animals* 12(8):1010. <https://doi.org/10.3390/ani12081010>
- Ahmed T.A., Ahmed S.M., El-Gammal Z., Shouman S., Ahmed A., Mansour R., El-Badri N. (2020) Oocyte Aging: The Role of Cellular and Environmental Factors and Impact on Female Fertility. *Adv. Exp. Med. Biol.* 8:109–123. https://doi.org/10.1007/5584_2019_456
- Akizawa H., Saito S., Kohri N., Furukawa E., Hayashi Y., Bai H., Nagano M., Yanagawa Y., Tsukahara H., Takahashi M., Kagawa S., Kawahara-Miki R., Kobayashi H., Kono T., Kawahara M. (2021) Deciphering two rounds of cell lineage segregations during bovine preimplantation development. *FASEB Journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 35(10):e21904. <https://doi.org/10.1096/fj.202002762RR>
- Alexopoulos N.I., Vajta G., Maddox-Hyttel P., French A.J., Trounson A.O. (2005) Stereomicroscopic and histological examination of bovine embryos following extended *in vitro* culture. *Reprod. Fertil. Dev.* 17(8):799–808. <https://doi.org/10.1071/rd04104>
- Al-Jaryan I.L., AL-Thuwaini T.M., AL-Jebory H.H. (2023) Heat Shock Protein 70 and Its Role in Alleviating Heat Stress and Improving Livestock Performance. *Rev. Agric. Sci.* 11:234–242. https://doi.org/10.7831/ras.11.0_234
- Al-Katanani Y.M., Hansen P.J. (2002) Induced thermotolerance in bovine two-cell embryos and the role of heat shock protein 70 in embryonic development. *Mol. Reprod. Dev.* 62(2):174–180. <https://doi.org/10.1002/mrd.10122>
- Al-Katanani Y.M., Paula-Lopes F.F., Hansen P.J. (2002) Effect of season and exposure to heat stress on oocyte competence in Holstein cows. *J. Dairy Sci.* 85:390–396. [https://doi.org/10.3168/jds.s0022-0302\(02\)74086-1](https://doi.org/10.3168/jds.s0022-0302(02)74086-1)

- Amaral C.S., Koch J., Correa Júnior E.E., Bertolin K., Mujica L.K.S., Fiorenza M.F., Rosa S.G., Nogueira C.W., Comim F.V., Portela V.V.M., Gonçalves P.B.D., Antoniazzi A.Q. (2020) Heat stress on oocyte or zygote compromises embryo development, impairs interferon tau production and increases reactive oxygen species and oxidative stress in bovine embryos produced *in vitro*. *Mol. Reprod. Dev.* 87(8):899–909. <https://doi.org/10.1002/mrd.23407>
- Archana P.R., Aleena J., Pragna P., Vidya M.K., Abdul Niyas P., Bagath M., Krishnan G., Manimaran A., Beena V., Kurien E., Sejian V., Bhatta R. (2017) Role of Heat Shock Proteins in Livestock Adaptation to Heat Stress. *J. Dairy Vet. Anim. Res.* 5(1):13–19. <https://doi.org/10.15406/jdvar.2017.05.00127>
- Arshad U., Sagheer M., González-Silvestry F.B., Hassan M., Sosa F. (2021) Vitrication improves in-vitro embryonic survival in *Bos taurus* embryos without increasing pregnancy rate post embryo transfer when compared to slow-freezing: A systematic meta-analysis. *Cryobiology* 101:1–11. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2021.06.007>
- Barbalho E.C., Nascimento D.R., Barrozo L.G., Paulino L.R.F.M., de Assis E.I.T., Silva J.R.V. (2024) Acquisition of Gonadotropin Dependence by Early Antral Follicles and the Challenges to Promote Their Growth *In vitro*. *Ciênc. Anim. Bras.* 25:e75908E. <https://doi.org/10.1590/1809-6891v25e-75908E>
- Barnwell C.V., Farin P.W., Ashwell C.M., Farmer W.T., Galphin S.P. Jr., Farin C.E. (2016) Differences in mRNA populations of short and long bovine conceptuses on Day 15 of gestation. *Mol. Reprod. Dev.* 83(5):424–441. <https://doi.org/10.1002/mrd.22640>
- Baruselli P.S., Ferreira R.M., Sá Filho M.F., Nasser L.F.T., Rodrigues C.A., Bó G.A. (2010) Bovine embryo transfer recipient synchronisation and management in tropical environments. *Reprod. Fertil. Dev.* 22(1):67–74. <https://doi.org/10.1071/rd09214>
- Baruselli P.S., R.M. Ferreira, J.N.S. Sales, L.U. Gimenes, M.F. Sá Filho, C.M. Martins, Rodrigues C.A., Bó G.A. (2011) Timed embryo transfer programs for management of donor and recipient cattle. *Theriogenology* 76(9):1583–1593. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2011.06.006>
- Baruselli P.S., Ferreira R.M., Vieira L.M., Souza A.H., Bó G.A., Rodrigues C.A. (2020) Use of embryo transfer to alleviate infertility caused by heat stress. *Theriogenology* 155:1–11. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2020.04.028>
- Basiricò L., Morera P., Primi V., Lacetera N., Nardone A., Bernabucci U. (2011) Cellular thermotolerance is associated with heat shock protein 70.1 genetic polymorphisms in Holstein lactating cows. *Cell Stress Chaperones* 16(4):441–448. <https://doi.org/10.1007/s12192-011-0257-7>
- Batista E.O., Macedo G.G., Sala R.V., Ortolan M.D., Sá Filho M.F., Del Valle T.A., Jesus E.F., Lopes R.N., Rennó F.P., Baruselli P.S. (2014) Plasma Antimüllerian Hormone as a Predictor of Ovarian Antral Follicular Population in *Bos indicus* (Nelore) and *Bos taurus* (Holstein) Heifers. *Reprod. Domest. Anim.* 49(3):448–452. <https://doi.org/10.1111/rda.12304>
- Berg D.K., Smith C.S., Pearton D.J., Wells D.N., Broadhurst R., Donnison M., Pfeffer P.L. (2011) Trophectoderm lineage determination in cattle. *Dev. Cell.* 20(2):244–255. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2011.01.003>

- Berg D.K., Ledgard A., Donnison M., McDonald R., Henderson H.V., Meier S., Juengel J.L., Burke C.R. (2022) The first week following insemination is the period of major pregnancy failure in pasture-grazed dairy cows. *J. Dairy Sci.* 105(11):9253–9270. <https://doi.org/10.3168/jds.2021-21773>
- Berkhout R.P., Keijser R., Repping S., Lambalk C.B., Afink G.B., Mastenbroek S., Hamer G. (2020) High-quality human preimplantation embryos stimulate endometrial stromal cell migration via secretion of microRNA hsa-miR-320a. *Hum. Reprod.* 35(8):1797–1807. <https://doi.org/10.1093/humrep/deaa149>
- Bermejo-Álvarez P., Lonergan P., Rizos D., Gutiérrez-Adán A. (2010) Low oxygen tension during IVM improves bovine oocyte competence and enhances anaerobic glycolysis. *Reprod. BioMed. Online* 20(3):341–349. <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2009.12.006>
- Block J., Hansen P.J. (2007) Interaction between season and culture with insulin-like growth factor-1 on survival of *in vitro* produced embryos following transfer to lactating dairy cows. *Theriogenology* 67(9):1518–1529. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2007.03.012>
- Bó G.A., Mapletoft R.J. (2013) Evaluation and classification of bovine embryos. *Anim. Reprod.* 10(3):344–348. Utolsó letöltés dátuma: 2026.06.08. <https://www.animal-reproduction.org/article/5b5a604cf7783717068b46a2>
- Bohmanova J., Misztal I., Cole J.B. (2007) Temperature-humidity indices as indicators of milk production losses due to heat stress. *J. Dairy Sci.* 90(4):1947–1956. <https://doi.org/10.3168/jds.2006-513>
- Bonilla A.Q.S., Oliveira L.J., Ozawa M., Newsom E.M., Lucy M.C., Hansen P.J. (2011) Developmental changes in thermoprotective actions of insulin-like growth factor-1 on the preimplantation bovine embryo. *Mol. Cell. Endocrinol.* 332:170–179. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2010.10.009>
- Brandão D.O., Maddox-Hyttel P., Løvendahl P., Rumpf R., Stringfellow D., Callesen H. (2004) Post hatching development: a novel system for extended *in vitro* culture of bovine embryos. *Biol. Reprod.* 71(6):2048–2055. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.103.025916>
- Breining E., Cetica P.D., Beconi M.T. (2010) Capacitation inducers act through diverse intracellular mechanisms in cryopreserved bovine sperm. *Theriogenology* 74(6):1036–1049. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2010.04.034>
- Brezov D., Hristov H., Dimov D., Alexiev K. (2023) Predicting the Rectal Temperature of Dairy Cows Using Infrared Thermography and Multimodal Machine Learning. *Appl. Sci.* 13(20):11416. <https://doi.org/10.3390/app132011416>
- Brigelius-Flohé R., Flohé, L. (2020) Regulatory Phenomena in the Glutathione Peroxidase Superfamily. *Antioxid. Redox Signal.* 33(7):498–516. <https://doi.org/10.1089/ars.2019.7905>
- Brinkhof B., van Tol H.T., Groot Koerkamp M.J., Wubbolts R.W., Haagsman H.P., Roelen B.A. (2017) Characterization of bovine embryos cultured under conditions appropriate for sustaining human naïve pluripotency. *PLoS ONE* 12(2):e0172920. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0172920>

- Brügemann K., Gernand E., König von Borstel U., König S. (2012) Defining and evaluating heat stress thresholds in different dairy cow production systems. *Arch. Anim. Breed.* 55(1):13–24. <https://doi.org/10.5194/aab-55-13-2012>
- Buffington D.E., Collazo-Arocho A., Canton G.H., Pitt D. (1981) Black Globe-Humidity Index (BGHI) as comfort equation for dairy cows, *Trans. ASAE*. 24:711–714. Utolsó letöltés dátuma: 2026.07.10. <https://www.cabidigitallibrary.org/doi/full/10.5555/19812412351>
- Burkuš J., Kačmarová M., Kubandová J., Kokošová N., Fabianová K., Fabian D., Koppel J., Čikoš Š. (2015) Stress exposure during the preimplantation period affects blastocyst lineages and offspring development. *J. Reprod. Dev.* 61(4):325–331. <https://doi.org/10.1262/jrd.2015-012>
- Capalbo A., Ubaldi F.M., Cimadomo D., Noli L., Khalaf Y., Farcomeni A., Ilic D., Rienzi, L. (2016) MicroRNAs in spent blastocyst culture medium are derived from trophectoderm cells and can be explored for human embryo reproductive competence assessment. *Fertil. Steril.* 105(1):225–235.e353. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2015.09.014>
- Carabaño M.J., Ramón M., Menéndez-Buxadera A., Molina A., Díaz C. (2019) Selecting for heat tolerance. *Anim. Front.* 9(1):62–68. <https://doi.org/10.1093/af/vfy033>
- Carreiro L.E., Dos Santos G.S., Luedke F.E., Goissis M.D. (2022) Cell differentiation events in pre-implantation mouse and bovine embryos. *Anim. Reprod.* 18(4):e20210054. <https://doi.org/10.1590/1984-3143-AR2021-0054>
- Carvalho L.R., Leite Albeny A.C., Silva E.B.M., Borges Á.M. (2024) Heat shock on bovine embryos from day 2.5-3 selects the most competent for progression to the blastocyst stage. *Theriogenology* 230:21–27. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2024.09.001>
- Cavallari F.C., Leal C.L.V., Zvi R., Hansen P.J. (2019) Effects of melatonin on production of reactive oxygen species and developmental competence of bovine oocytes exposed to heat shock and oxidative stress during *in vitro* maturation. *Zygote* 27(3):180–186. <https://doi.org/10.1017/S0967199419000236>
- Cebrian-Serrano A., Salvador I., García-Roselló E., Pericuesta E., Pérez-Cerezales S., Gutierrez-Adán A., Coy P., Silvestre M.A. (2013) Effect of the bovine oviductal fluid on *in vitro* fertilization, development and gene expression of *in vitro*-produced bovine blastocysts. *Reprod. Domest. Anim.* 48(2):331–338. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2012.02157.x>
- Cheruiyot E.K., Haile-Mariam M., Cocks B.G., MacLeod I.M., Xiang R., Pryce J.E. (2021) New loci and neuronal pathways for resilience to heat stress in cattle. *Sci. Rep.* 11(1):16619. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-95816-8>
- Chung H., Li J., Kim Y., Van Os J.M.C., Brounts S.H., Choi C.Y. (2020) Using Implantable Biosensors and Wearable Scanners to Monitor Dairy Cattle's Core Body Temperature in Real-Time. *Comput. Electron. Agric.* 174:105453. <https://doi.org/10.1016/j.compag.2020.105453>
- Collier R.J., Collier J.L., Rhoads R.P., Baumgard L.H. (2008) Invited review: genes involved in the bovine heat stress response. *J. Dairy Sci.* 91(2):445–454. <https://doi.org/10.3168/jds.2007-0540>

- Cortvriendt R., Smits J. (2001) *In vitro* follicle growth: achievements in mammalian species. *Reprod. Domest. Anim.* 36(1):3–9. <https://doi.org/10.1046/j.1439-0531.2001.00261.x>
- Crowe A.D., Lonergan P., Butler S.T. (2021) Invited review: Use of assisted reproduction techniques to accelerate genetic gain and increase value of beef production in dairy herds. *J. Dairy Sci.* 104(12):12189–12206. <https://doi.org/10.3168/jds.2021-20281>
- Crowe A.D., Sánchez J.M., Moore S.G., McDonald M., McCabe M.S., Randi F., Lonergan P., Butler S.T. (2025) Incidence and timing of pregnancy loss following timed artificial insemination or timed embryo transfer with a fresh or frozen *in vitro*-produced embryo. *J. Dairy Sci.* 108(1):1022–1038. <https://doi.org/10.3168/jds.2024-25139>
- da Costa A.N.L., Feitosa J.V., Júnior P.A.M., de Souza P.T., de Araújo A.A. (2015) Hormonal profiles, physiological parameters, and productive and reproductive performances of Girolando cows in the state of Ceará-Brazil. *Int. J. Biometeorol.* 59:231–236. <https://doi.org/10.1007/s00484-014-0838-0>
- Dalcin L., Lucci C. (2010) Criopreservação de embriões de animais de produção: princípios criobiológicos e estado atual. *Rev. Bras. Reprod. Anim.* 34(3):149–159. Utolsó letöltés dátuma: 2026.07.12. <http://www.cbra.org.br/pages/publicacoes/rbra/v34n3/RB264%20pag149-159.pdf>
- Danso F., Iddrisu L., Lungu S.E., Zhou G., Ju X. (2024) Effects of Heat Stress on Goat Production and Mitigating Strategies: A Review. *Animals* 14(12):1793. <https://doi.org/10.3390/ani14121793>
- Dantas F.G., Reese S.T., Filho R.V.O., Carvalho R.S., Franco G.A., Abbott C.R., Payton R.R., Edwards J.L., Russell J.R., Smith J.K., Pohler K.G. (2019) Effect of complexed trace minerals on cumulus-oocyte complex recovery and *in vitro* embryo production in beef cattle^{1,2}. *J. Anim. Sci.* 97(4):1478–1490. <https://doi.org/10.1093/jas/skz005>
- Das R., Sailo L., Verma N., Bharti P., Saikia J., Imtiwati, Kumar R. (2016) Impact of heat stress on health and performance of dairy animals: A review. *Vet. World.* 9(3):260–268. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2016.260-268>
- De Barros F.R.O., Paula-Lopes F.F. (2018) Cellular and epigenetic changes induced by heat stress in bovine preimplantation embryos. *Mol. Reprod. Dev.* 85(11):810–820. <https://doi.org/10.1002/mrd.23040>
- Deluao J.C., Winstanley Y., Robker R.L., Pacella-Ince L., Gonzalez M.B., McPherson N.O. (2022) OXIDATIVE STRESS AND REPRODUCTIVE FUNCTION: Reactive oxygen species in the mammalian pre-implantation embryo. *Reproduction* 164(6):F95–F108. <https://doi.org/10.1530/REP-22-0121>
- Demetrio D.G.B., Santos R.M., Demetrio C.G., Vasconcelos J.L. (2007) Factors affecting conception rates following artificial insemination or embryo transfer in lactating Holstein cows. *J. Dairy Sci.* 90(11):5073–5082. <https://doi.org/10.3168/jds.2007-0223>

- Demetrio D.G.B., Barfield J. (2021) Appendix 2: Photographic illustrations of bovine cumulus–oocyte complexes. In: Leelawardana S., Perry G., Fiéni F. (Ed.) Manual of the International Embryo Technology Society (5th ed.) Champaign, IL, USA. pp. 414–420. ISBN 979-8-218-70106-2. Utolsó letöltés dátuma: 2026.09.11. <https://www.iets.org/LinkClick.aspx?fileticket=EDZHeXfltj8%3d&portalid=0>
- Denicol A.C., Siqueira L.G.B. (2023) Maternal contributions to pregnancy success: from gamete quality to uterine environment. *Anim. Reprod.* 20(2):e20230085. <https://doi.org/10.1590/1984-3143-AR2023-0085>
- De Rensis F., López-Gatius F., García-Ispuerto I., Morini G., Scaramuzzi R.J. (2017) Causes of declining fertility in dairy cows during the warm season. *Theriogenology* 91:145–153. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.12.024>
- Desmet K.L.J., Marei W.F.A., Richard C., Sprangers K., Beemster G.T.S., Meysman P., Laukens K., Declerck K., Vanden Berghe W., Bols P.E.J., Hue I., Leroy J.L.M.R. (2020) Oocyte maturation under lipotoxic conditions induces carryover transcriptomic and functional alterations during post-hatching development of good-quality blastocysts: novel insights from a bovine embryo-transfer model. *Hum. Reprod.* 35(2):293–307. <https://doi.org/10.1093/humrep/dez248>
- De S Torres-Júnior J.R., de F A Pires M., de Sá W.F., de M Ferreira A., Viana J.H., Camargo L.S., Ramos A.A., Folhadella I.M., Polisseni J., de Freitas C., Clemente C.A., de Sá Filho M.F., Paula-Lopes F.F., Baruselli P.S. (2008) Effect of maternal heat-stress on follicular growth and oocyte competence in *Bos indicus* cattle. *Theriogenology* 69(2):155–166. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2007.06.023>
- Dias L.R.O., Leme L.O., Sprícigo J.F.W., Pivato I., Dode M.A.N. (2020) Effect of delipidant agents during *in vitro* culture on the development, lipid content, gene expression and cryotolerance of bovine embryos. *Reprod. Domest. Anim.* 55(1):11–20. <https://doi.org/10.1111/rda.13579>
- Diaz F.A., Gutierrez E.J., Foster B.A., Hardin P.T., Bondioli K.R. (2025) Effect of *In vivo* and *In vitro* Heat Stress on DNA Methylation and DNA Hydroxymethylation of Bovine Oocytes and Early Embryos. *Theriogenology* 240:117400. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2025.117400>
- Dikmen S., Khan F.A., Huson H.J., Sonstegard T.S., Moss J.I., Dahl G.E., Hansen P.J. (2014) The SLICK hair locus derived from Senepol cattle confers thermotolerance to intensively managed lactating Holstein cows. *J. Dairy Sci.* 97(9):5508–5520. <https://doi.org/10.3168/jds.2014-8087>
- Diskin M.G., Murphy J.J., Sreenan J.M. (2006) Embryo survival in dairy cows managed under pastoral conditions. *Anim. Reprod. Sci.* 96(3-4):297–311. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2006.08.008>
- Diskin M.G., Morris D.G. (2008) Embryonic and early foetal losses in cattle and other ruminants. *Reprod. Domest. Anim.* 43(2):260–267. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2008.01171.x>

- Do V.H., Walton S., Catt S., Taylor-Robinson A.W. (2017) A comparative analysis of the efficacy of three cryopreservation protocols on the survival of *in vitro*-derived cattle embryos at pronuclear and blastocyst stages. *Cryobiology* 77:58–63. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2017.05.007>
- Dos Santos Mendonça-Soares A., Guimarães A.L.S., Fidelis A.A.G., Franco M.M., Dode M.A.N. (2022) The use of insulin-transferrin-selenium (ITS), and folic acid on individual *in vitro* embryo culture systems in cattle. *Theriogenology* 184:153–161. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2022.03.008>
- Du Y., Xia Y., Xu J., Liu Z., Liu Z., Zhang M., Xu G., Xing X., Du, F. (2024) Effects of donor age and reproductive history on developmental potential of ovum pickup oocytes in Japanese Black cattle (Wagyu). *Theriogenology* 221:25–30. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2024.03.012>
- Dunning K.R., Robker R.L. (2017) The Role of L-Carnitine during Oocyte *in vitro* Maturation: Essential Co-Factor? *Anim. Reprod.* 14:469–475. <https://doi.org/10.21451/1984-3143-AR988>
- Dvoran M., Nemcova L., Kalous J. (2022) An Interplay between Epigenetics and Translation in Oocyte Maturation and Embryo Development: Assisted Reproduction Perspective. *Biomedicines* 10(7):1689. <https://doi.org/10.3390/biomedicines10071689>
- Ealy A.D., Wooldridge L.K., McCoski S.R. (2019) BOARD INVITED REVIEW: Post-transfer consequences of *in vitro*-produced embryos in cattle. *J. Anim. Sci.* 97(6):2555–2568. <https://doi.org/10.1093/jas/skz116>
- Elgebaly M.M., Hazaa A.B.M., Amer H.A., Mesalam A. (2022) L-Cysteine improves bovine oocyte developmental competence *in vitro* via activation of oocyte-derived growth factors BMP-15 and GDF-9. *Reprod. Domest. Anim.* 57(7):734–742. <https://doi.org/10.1111/rda.14113>
- El-Sheikh A.H., Kitahara G., Tamura Y., Kobayashi I., Hemmi K., Torisu S., Sameshima H., Horii Y., Zaabel S., Kamimura S. (2013) Presence of a temperature gradient among genital tract portions and the thermal changes within these portions over the estrous cycle in beef cows. *J. Reprod. Dev.* 59(1):59–65. <https://doi.org/10.1262/jrd.2012-017>
- Erasmus L., van Marle-Köster E. (2025) Heat stress in dairy cows: A review of abiotic and biotic factors, with reference to the subtropics. *S. Afr. J. Anim. Sci.* 55(1):10–23. <https://doi.org/10.4314/sajas.v55i1.02>
- Fair T., Lonergan P., Dinnyes A., Cottell D.C., Hyttel P., Ward F.A., Boland M.P. (2001) Ultrastructure of bovine blastocysts following cryopreservation: effect of method of blastocyst production. *Mol. Reprod. Dev.* 58(2):186–195. [https://doi.org/10.1002/1098-2795\(200102\)58:2<186::AID-MRD8>3.0.CO;2-N](https://doi.org/10.1002/1098-2795(200102)58:2<186::AID-MRD8>3.0.CO;2-N)
- Fear J.M., Hansen P.J. (2011) Developmental changes in expression of genes involved in regulation of apoptosis in the bovine preimplantation embryo. *Biol Reprod.* 84(1):43–51. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.110.086249>

- Feltes G.L., Negri R., Raidan F.S.S., Viana A.F.P., Feres L.F.R., Ribeiro V.M.P., Cobuci J.A. (2023) Impact of heat stress on genetic evaluation of oocyte and embryo production in Gir dairy cattle. *Trop Anim Health Prod.* 56(1):7. <https://doi.org/10.1007/s11250-023-03850-7>
- Feng X., Li C., Zhang H., Zhang P., Shahzad M., Du W., Zhao, X. (2024) Heat-Stress Impacts on Developing Bovine Oocytes: Unraveling Epigenetic Changes, Oxidative Stress, and Developmental Resilience. *Int. J. Mol. Sci.* 25(9):4808. <https://doi.org/10.3390/ijms25094808>
- Ferré L.B., Kjelland M.E., Strøbech L.B., Hyttel P., Mermillod P., Ross P.J. (2020) Review: recent advances in bovine *in vitro* embryo production: reproductive biotechnology history and methods. *Animal* 14(5):991–1004. <https://doi.org/10.1017/S1751731119002775>
- Filho R.V.O., Franco G.A., Reese S.T., Dantas F.G., Fontes P.L.P., Cooke R.F., Rhinehart J.D., Thompson K.W., Pohler K.G. (2020) Using pregnancy associated glycoproteins (PAG) for pregnancy detection at day 24 of gestation in beef cattle. *Theriogenology* 141:128–133. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2019.09.014>
- Freitas B.G., Rodrigues C.A., Sales J.N.S., Teixeira A.A., Ferreira R.M., Ayres H., Ranieri A.L., Baruselli P.S. (2010) Embryonic loss (between 30 and 60 days) followed to artificial insemination or embryo transfer in high production Friesian dairy cattle. *Acta Sci. Vet.* 38:s675–s821. <https://doi.org/10.13140/2.1.5058.3682>
- Galli C., Duchi R., Colleoni S., Lagutina I., Lazzari G. (2014) Ovum pick up, intracytoplasmic sperm injection and somatic cell nuclear transfer in cattle, buffalo and horses: from the research laboratory to clinical practice. *Theriogenology* 81(1):138–151. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2013.09.008>
- Garner J.B., Douglas M., Williams S.R.O., Wales W.J., Marett L.C., DiGiacomo K., Leury B.J., Hayes B.J. (2017) Responses of Dairy Cows to Short-Term Heat Stress in Controlled-Climate Chambers. *Anim. Prod. Sci.* 57(7):1233–1241. <https://doi.org/10.1071/AN16472>
- Gaughan J.B., Mader T.L., Holt S.M., Lisle A. (2008) A new heat load index for feedlot cattle. *J. Anim. Sci.* 86(1):226–234. <https://doi.org/10.2527/jas.2007-0305>
- Giaccarì C., Cecere F., Argenziano L., Pagano A., Riccio A. (2024) New insights into oocyte cytoplasmic lattice-associated proteins, *Trends Genet.* 40(10):880–890. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2024.06.002>
- Gordon I. (2003) *In vitro* fertilization. In: Gordon I. (Ed.) *Laboratory production of cattle embryos*. CABI Publishing, Oxon, UK. pp. 176–219. ISBN 0 85199 666 3. Utolsó letöltés dátuma: 2026.03.18. <https://rexresearch1.com/CattleLibrary/LabProductionCattleEmbryos.pdf>
- Gupta M., Vaidya M., Kumar S., Singh G., Osei-Amponsah R., Chauhan S.S. (2024) Heat stress: a major threat to ruminant reproduction and mitigating strategies. *Int. J. Biometeorol.* 69(1):209–224. <https://doi.org/10.1007/s00484-024-02805-3>
- Hallberg I., Laskowski D., Sjunnesson Y.C.B. (2026) *In vitro* maturation of bovine and porcine oocytes as a versatile model for toxicity and metabolism studies, *Biol. Reprod.* 114(2):421–431. <https://doi.org/10.1093/biolre/ioaf137>

- Hansen P.J. (2007) Exploitation of genetic and physiological determinants of embryonic resistance to elevated temperature to improve embryonic survival in dairy cattle during heat stress. *Theriogenology* 68(S1):S242–S249. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2007.04.008>
- Hansen P.J. (2013) Antecedents of mammalian fertility: Lessons from the heat-stressed cow regarding the importance of oocyte competence for fertilization and embryonic development, *Anim. Front.* 3(4):34–39. <https://doi.org/10.2527/af.2013-0031>
- Hansen P.J. (2020a) Implications of assisted reproductive technologies for pregnancy outcomes in mammals. *Annu Rev Anim Biosci.* 8(1):395–413. <https://doi.org/10.1146/annurev-animal-021419-084010>
- Hansen P.J. (2020b) The incompletely fulfilled promise of embryo transfer in cattle-why aren't pregnancy rates greater and what can we do about it? *J Anim Sci.* 98(11):skaa288. <https://doi.org/10.1093/jas/skaa288>
- Hariyono D., Prihandini P. (2022) Association of selected gene polymorphisms with thermotolerance traits in cattle – A review. *Anim. Biosci.* 35(11):1635–1648. <https://doi.org/10.5713/ab.22.0055>
- Hasler J.F., Barfield J.P. (2021) *In vitro* Fertilization. In: *Bovine Reproduction*. Hopper R.M. (Ed.). Chapter 89. ISBN 9781119602361. <https://doi.org/10.1002/9781119602484.ch89>
- Hassan F.U., Nawaz A., Rehman M.S., Ali M.A., Dilshad S.M.R., Yang C. (2019) Prospects of HSP70 as a genetic marker for thermo-tolerance and immuno-modulation in animals under climate change scenario. *Anim. Nutr.* 5(4):340–350. <https://doi.org/10.1016/j.aninu.2019.06.005>
- He M., Zhang T., Yang Y., Wang C. (2021) Mechanisms of Oocyte Maturation and Related Epigenetic Regulation. *Front. Cell Dev. Biol.* 9:654028. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.654028>
- Held-Hoelker E., Haake L.S., Kurzella J., Schreiber M., Dauben C., Salilew-Wondim D., Ghanem N., Rings F., Große-Brinkhaus C., Tholen E., Tesfaye D., Hoelker M. (2025) Heat stress during maturation of bovine oocytes profoundly impacts the mitochondrial bioenergetic profile and causes endoplasmic reticulum stress in subsequent blastocysts. *Biol. Reprod.* 112(6):1100–1113. <https://doi.org/10.1093/biolre/ioaf070>
- Herbut P., Bieda W., Angrecka S. (2015) Influence of hygrothermal conditions on milk production in a free stall barn during hot weather. *Anim. Sci. Pap. Rep.* 33:49–58. Utolsó letöltés dátuma: 2026.04.18. https://www.researchgate.net/publication/278330053_Influence_of_hygrothermal_conditions_on_milk_production_in_a_free_stall_barn_during_hot_weather
- Herbut P., Angrecka S., Godyn D., Hoffmann G. (2019) The physiological and productivity effects of heat stress in cattle – a review. *Ann. Anim. Sci.* 19:579–593. <https://doi.org/10.2478/aoas-2019-0011>
- Hernandez-Fonseca H.J., Bosch P., Miller D.M., Wininger J.D., Massey J.B., Brackett B.G. (2005) Time course of follicular development after bovine ovarian tissue transplantation in male non-obese diabetic severe combined immunodeficient mice. *Fertil. Steril.* 83:1180–1187. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2004.07.985>

- Hoffmann G., Herbut P., Pinto S., Heinicke J., Kuhla B., Amon T. (2020) Animal-Related, Non-Invasive Indicators for Determining Heat Stress in Dairy Cows. *Biosyst. Eng.* 199:83–96. <https://doi.org/10.1016/j.biosystemseng.2019.10.017>
- Hosoe M., Furusawa T., Hayashi K-G., Takahashi T., Hashiyada Y., Kizaki K., Hashizume K., Tokunaga T., Matsuyama S., Sakumoto R. (2019) Characterisation of bovine embryos following prolonged culture in embryonic stem cell medium containing leukaemia inhibitory factor. *Reprod. Fertil. Dev.* 31(6):1157–1165. <https://doi.org/10.1071/RD18343>
- Hu C., Yang J., Qi Z., Wu H., Wang B., Zou F., Mei H., Liu J., Wang W., Liu Q. (2022) Heat shock proteins: Biological functions, pathological roles, and therapeutic opportunities. *MedComm* 3(3):e161. <https://doi.org/10.1002/mco2.161>
- Hu L., Fang H., Abbas Z., Luo H., Brito L.F., Wang Y., Xu Q. (2024) The *HSP90AA1* Gene Is Involved in Heat Stress Responses and Its Functional Genetic Polymorphisms Are Associated with Heat Tolerance in Holstein Cows. *J. Dairy Sci.* 107(7):5132–5149. <https://doi.org/10.3168/jds.2023-24007>
- Huber E., Notaro U.S., Recce S., Rodríguez F.M., Ortega H.H., Salvetti N.R., Rey F. (2020) Fetal programming in dairy cows: Effect of heat stress on progeny fertility and associations with the hypothalamic-pituitary-adrenal axis functions. *Anim. Reprod. Sci.* 216:106348. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2020.106348>
- Inaba Y., Miyashita S., Somfai T., Geshi M., Matoba S., Dochi O., Nagai T. (2016) Cryopreservation method affects DNA fragmentation in trophectoderm and the speed of re-expansion in bovine blastocysts. *Cryobiology* 72(2):86–92. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2016.03.006>
- Inadagbo O., Makowski G., Ahmed A.A., Daigle C. (2024) On Developing a Machine Learning-Based Approach for the Automatic Characterization of Behavioral Phenotypes for Dairy Cows Relevant to Thermotolerance. *AgriEngineering* 6(3):2656–2677. <https://doi.org/10.3390/agriengineering6030155>
- Jianfang W., Raza S.H.A., Pant S.D., Juan Z., Prakash A., Abdelnour S.A., Aloufi B.H., Mahasneh Z.M.H., Amin A.A., Shokrollahi B., Zan L. (2025) Exploring Epigenetic and Genetic Modulation in Animal Responses to Thermal Stress. *Mol. Biotechnol.* 67(3):942–956. <https://doi.org/10.1007/s12033-024-01126-5>
- Jiang Z., Sun J., Dong H., Luo O., Zheng X., Oberfell C., Tang Y., Bi J., O'Neill R., Ruan Y., Chen J., Tian X.C. (2014) Transcriptional profiles of bovine *in vivo* pre-implantation development. *BMC genomics* 15(1):756. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-15-756>
- Jiang Z. (2025) Molecular Factors Driving the Development of Bovine Embryos and Embryo-like Structures. *Anim. Reprod.* 22(3):e20250056. <https://doi.org/10.1590/1984-3143-AR2025-0056>
- Ju J.C., Tseng J.K. (2004) Nuclear and cytoskeletal alterations of *in vitro* matured porcine oocytes under hyperthermia. *Mol. Reprod. Dev.* 68(1):125–133. <https://doi.org/10.1002/mrd.20054>

- Kasimanickam R., Kasimanickam V. (2021) Impact of heat stress on embryonic development during first 16 days of gestation in dairy cows. *Sci. Rep.* 11(1):14839. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-94278-2>
- Kasimanickam R.K., Kasimanickam V.R., Kumar N., Reisenauer C. (2021) Day 7 embryo quality and suboptimal uterine environment influence morphometry of Day 16 conceptus in dairy cows. *Theriogenology* 163:10–17. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2021.01.004>
- Kawano K., Sakaguchi K., Madalitso C., Ninpetch N., Kobayashi S., Furukawa E., Yanagawa Y., Katagiri S. (2022) Effect of heat exposure on the growth and developmental competence of bovine oocytes derived from early antral follicles. *Sci. Rep.* 12(1):8857. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-12785-2>
- Kelly E., Cho T. (2014) Incubators old and new. In: Quinn P. (Ed.) Culture media, solutions, and systems in human ART, Cambridge University Press, Cambridge, UK (2014), p. 258–269. ISBN 978-1-107-61953-1. <https://doi.org/10.1017/CBO9781139059053.021>
- Khan A., Khan M.Z., Umer S., Khan I.M., Xu H., Zhu H., Wang, Y. (2020) Cellular and Molecular Adaptation of Bovine Granulosa Cells and Oocytes under Heat Stress. *Animals* 10(1):110. <https://doi.org/10.3390/ani10010110>
- Khan I., Lee K.L., Xu L., Mesalam A., Chowdhury M.M., Joo M.D., Ihsan-Ul-Haq, Mirza B., Kong I.K. (2017) Improvement of *in vitro*-produced bovine embryo treated with coagulansin-A under heat-stressed condition. *Reproduction* 153(4):421–431. <https://doi.org/10.1530/REP-16-0530>
- Khatir H., Lonergan P., Carolan C., Mermillod P. (1996) Prepubertal Bovine Oocyte: A Negative Model for Studying Oocyte Developmental Competence. *Mol. Reprod. Dev.* 45(2):231–239. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1098-2795\(199610\)45:2%3C231::aid-mrd17%3E3.0.co;2-3](https://doi.org/10.1002/(sici)1098-2795(199610)45:2%3C231::aid-mrd17%3E3.0.co;2-3)
- Kizaki K., Shichijo-Kizaki A., Furusawa T., Takahashi T., Hosoe M., Hashizume K. (2013) Differential neutrophil gene expression in early bovine pregnancy. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 11:6. <https://doi.org/10.1186/1477-7827-11-6>
- Koch F., Lamp O., Eslamizad M., Weitzel J., Kuhla B. (2016) Metabolic response to heat stress in late-pregnant and early lactation dairy cows: implications to liver-muscle crosstalk. *PLoS ONE* 11(8):e0160912. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0160912>
- Konstantogianni O., Panou T., Zikopoulos A., Skentou C., Stavros S., Asimakopoulos B. (2024) Culture of Human Embryos at High and Low Oxygen Levels. *J. Clin. Med.* 13(8):2222. <https://doi.org/10.3390/jcm13082222>
- Kovacs P. (2014) Embryo selection: the role of time-lapse monitoring. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 12:1–11. <https://doi.org/10.1186/1477-7827-12-124>
- Kozomara A., Birgaoanu M., Griffiths-Jones S. (2019) miRBase: from microRNA sequences to function. *Nucleic Acids Res.* 47(D1):D155–D162. <https://doi.org/10.1093/nar/gky1141>
- Krisher R.L., Herrick J.R. (2024) Bovine embryo production *in vitro*: evolution of culture media and commercial perspectives. *Anim. Reprod.* 21(3):e20240051. <https://doi.org/10.1590/1984-3143-AR2024-0051>

- Krishnan G., Bagath M., Pragna P., Vidya M.K., Aleena J., Archana P.R., Sejian V., Bhatta R. (2017) Mitigation of the Heat Stress Impact in Livestock Reproduction. In: Payan-Carreira R. (Ed.) *Theriogenology*. Intech Open. ISBN 978-953-51-3478-7. <https://doi.org/10.5772/intechopen.69091>
- Kruip T.A.M., Cran D.G., van Beneden T.H., Dieleman S.J. (1983) Structural changes in bovine oocytes during final maturation *in vivo*. *Gamete Res.* 8:29–47. Utolsó letöltés dátuma: 2026.06.11. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/mrd.1120080105>
- Kues W.A., Sudheer S., Herrmann D., Carnwath J.W., Havlicek V., Besenfelder U., Lehrach H., Adjaye J., Niemann H. (2008) Genome-wide expression profiling reveals distinct clusters of transcriptional regulation during bovine preimplantation development *in vivo*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105(50):19768–19773. <https://doi.org/10.1073/pnas.0805616105>
- Landry D.A., Bellefleur A.-M., Labrecque R., Grand F.-X., Vigneault C., Blondin P., Sirard M.-A. (2016) Effect of Cow Age on the *in vitro* Developmental Competence of Oocytes Obtained after FSH Stimulation and Coasting Treatments. *Theriogenology* 86(5):1240–1246. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.04.064>
- Lane M., Maybach J., Hooper K., Hasler J.F., Gardner D.K. (2003) Cryosurvival and development of bovine blastocysts are enhanced by culture with recombinant albumin and hyaluronan. *Mol. Reprod. Dev.* 64(1):70–78. <https://doi.org/10.1002/mrd.10210>
- Lawrence J.L., Payton R.R., Godkin J.D., Saxton A.M., Schrick F.N., Edwards J.L. (2004) Retinol improves development of bovine oocytes compromised by heat stress during maturation. *J. Dairy Sci.* 87(8):2449–2454. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(04\)73368-8](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(04)73368-8)
- Lees A.M., Lea J.M., Salvin H.E., Cafe L.M., Colditz I.G., Lee C. (2018b) Relationship between Rectal Temperature and Vaginal Temperature in Grazing Bos taurus Heifers. *Animals* 8(9):156. <https://doi.org/10.3390/ani8090156>
- Lees J.C., Lees A.M., Gaughan J.B. (2018a) Developing a heat load index for lactating dairy cows. *Anim. Prod. Sci.* 58(8):1387–1391. <https://doi.org/10.1071/AN17776>
- Leibfried-Rutledge M.L., Critser E.S., Eyestone W.H., Northey D.L., First N.L. (1987) Development potential of bovine oocytes matured *in vitro* or *in vivo*. *Biol. Reprod.* 36(2):376–383. <https://doi.org/10.1095/biolreprod36.2.376>
- Leme L.O., Carvalho J.O., Franco M.M., Dode M.A.N. (2020) Effect of Sex on Cryotolerance of Bovine Embryos Produced *in vitro*. *Theriogenology* 141:219–227. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2019.05.002>
- Leroy J.L.M.R., Rizos D., Sturmey R., Bossaert P., Gutierrez-Adan A., Van Hoeck V., Valckx S., Bols P.E.J. (2012) Intrafollicular Conditions as a Major Link between Maternal Metabolism and Oocyte Quality: A Focus on Dairy Cow Fertility. *Reprod. Fertil. Dev.* 24(1):1–12. <https://doi.org/10.1071/rd11901>
- Leso L., Barbari M., Lopes M.A., Damasceno F.A., Galama P., Taraba J.L., Kuipers A. (2020) Invited review: Compost-bedded pack barns for dairy cows. *J. Dairy Sci.* 103(2):1072–1099. <https://doi.org/10.3168/jds.2019-16864>

- Lima R.S. de, Assumpção M.E.O.D., Visitin J.A., Lopes F.F. de P. (2013) Cellular alterations induced by heat stress in bovine embryos. *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.* 50(4):257–264. <https://doi.org/10.11606/issn.2318-3659.v50i4p257-264>
- Lin T., Lee J.E., Kang J.W., Oqani R.K., Cho E.S., Kim S.B., Il Jin D. (2018) Melatonin supplementation during prolonged *in vitro* maturation improves the quality and development of poor-quality porcine oocytes via anti-oxidative and anti-apoptotic effects. *Mol. Reprod. Dev.* 85(8-9):665–681. <https://doi.org/10.1002/mrd.23052>
- Loi P., Toschi P., Zacchini F., Ptak G., Scapolo P.A., Capra E., Marsan P.A., Williams J.L. (2016) Synergies between assisted reproduction technologies and functional genomics. *Genet. Sel. Evol.* 48(1):53. <https://doi.org/10.1186/s12711-016-0231-z>
- Loneragan P., Fair T. (2016) Maturation of oocytes *in vitro*. *Annu. Rev. Anim. Biosci.* 4:255–268. <https://doi.org/10.1146/annurev-animal-022114-110822>
- Longo M., Liuzzi F., De Carlini S., La Marca A. (2025) The role of LH in follicle development: from physiology to new clinical implications. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 23(S1):22. <https://doi.org/10.1186/s12958-025-01353-8>
- López H., Caraviello D.Z., Satter L.D., Fricke P.M., Wiltbank M.C. (2005) Relationship between Level of Milk Production and Multiple Ovulations in Lactating Dairy Cows. *J. Dairy Sci.* 88(8):2783–2793. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(05\)72958-1](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(05)72958-1)
- López-Gatius F., Hunter R.H.F. (2020) Local cooling of the ovary and its implications for heat stress effects on reproduction. *Theriogenology* 149:98–103. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2020.03.029>
- Loureiro B., Block J., Favoreto M.G., Carambula S., Pennington K.A., Ealy A.D., Hansen P.J. (2011) Consequences of conceptus exposure to colony-stimulating factor 2 on survival, elongation, interferon- τ secretion, and gene expression. *Reproduction* 141(5):617–624. <https://doi.org/10.1530/rep-10-0511>
- Machado G.M., Caixeta E.S., Lucci C.M., Rumpf R., Franco M.M., Dode M.A.N. (2012) Post-hatching development of bovine embryos *in vitro*: the effects of tunnel preparation and gender. *Zygote* 20(2):123–134. <https://doi.org/10.1017/s0967199411000086>
- Madeja Z.E., Sosnowski J., Hryniewicz K., Warzych E., Pawlak P., Rozwadowska N., Plusa B., Lechniak D. (2013) Changes in sub-cellular localisation of trophoblast and inner cell mass specific transcription factors during bovine preimplantation development. *BMC Dev. Biol.* 13:32. <https://doi.org/10.1186/1471-213X-13-32>
- Mader T.L., Davis M.S., Brown-Brandl T. (2006) Environmental factors influencing heat stress in feedlot cattle, *J. Anim. Sci.* 84(3):712–719. <https://doi.org/10.2527/2006.843712x>
- Magata F. (2023) Time-lapse monitoring technologies for the selection of bovine *in vitro* fertilized embryos with high implantation potential. *J. Reprod. Dev.* 69(2):57–64. <https://doi.org/10.1262/jrd.2022-131>

- Marsico T.V., Caetano D.P., Rodrigues R., Valente R.S., Fontes P.K., Mesquita F.S., Andrade S.C.D.S., Basso A.C., Nogueira M.F.G., Sudano M.J. (2020) Transcriptional profiling of embryo cryotolerance. *Mol. Reprod. Dev.* 87(12):1245–1259. <https://doi.org/10.1002/mrd.23436>
- Marsico T.V., de Camargo J., Valente R.S., Sudano M.J. (2019) Embryo Competence and Cryosurvival: Molecular and Cellular Features. *Anim. Reprod.* 16(3):423–439. <https://doi.org/10.21451/1984-3143-ar2019-0072>
- Martínez de Los Reyes N., Siegmund-Sabater A., Flores-Borobia I., González-Brusi L., Salvo-Jiménez A., Marigorta P., Bermejo-Álvarez P., Ramos-Ibeas P. (2026) Extended embryo culture: illuminating a black box of early development in ruminants. *Reprod. Fertil. Dev.* 38(1):RD25156. <https://doi.org/10.1071/RD25156>
- McGeary S.E., Lin K.S., Shi C.Y., Pham T.M., Bisaria N., Kelley G.M., Bartel D.P. (2019) The Biochemical Basis of MicroRNA Targeting Efficacy. *Science* 366(6472):eaav1741. <https://doi.org/10.1126/science.aav1741>
- McKeegan P.J., Sturmey R.G. (2011) The role of fatty acids in oocyte and early embryo development. *Reprod. Fertil. Dev.* 24(1):59–67. <https://doi.org/10.1071/rd11907>
- Men H. (2024) Evolution of Media Supporting the Development of Mammalian Preimplantation Embryos *In vitro*. *Biology* 13(10):789. <https://doi.org/10.3390/biology13100789>
- Messeri A., Mancini M., Bozzi R., Parrini S., Sirtori F., Morabito M., Crisci A., Messeri G., Ortolani A., Gozzini B., Orlandini S., Fibbi L., Cristofori S., Grifoni D. (2023) Temperature-humidity index monitoring during two summer seasons in dairy cow sheds in Mugello (Tuscany). *Int. J. Biometeorol.* 67(10):1555–1567. <https://doi.org/10.1007/s00484-023-02510-7>
- Miętowska K., Kordowitzki P., Pareek C.S. (2022) Effects of Heat Stress on Bovine Oocytes and Early Embryonic Development - An Update. *Cells* 11(24):4073. <https://doi.org/10.3390/cells11244073>
- Missio D., Fritzen A., Cupper Vieira C., Germano Ferst J., Farias Fiorenza M., Guedes de Andrade L., Martins de Menezes B., Bisneto, Tomazele Rovani M., Gazieira Gasperin B., Dias Gonçalves P.B., Ferreira R. (2022) Increased β -hydroxybutyrate (BHBA) concentration affect follicular growth in cattle. *Anim. Reprod. Sci.* 243:107033. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2022.107033>
- Moawad A.R., Choi I. (2025) Improvement of oocyte *in vitro* maturation for assisted reproductive technology application in mammal. *Korean J. Agric. Sci.* 52(4):383–396. <https://doi.org/10.7744/kjoas.520401>
- Mori M., Hayashi T., Isozaki Y., Takenouchi N., Sakatani M. (2015) Heat shock decreases the embryonic quality of frozen-thawed bovine blastocysts produced *in vitro*. *J. Reprod. Dev.* 61(5):423–429. <https://doi.org/10.1262/jrd.2015-003>
- Morton J.M., Tranter W.P., Mayer D.G., Jonsson N.N. (2007) Effects of environmental heat on conception rates in lactating dairy cows: critical periods of exposure. *J. Dairy Sci.* 90(5):2271–2278. <https://doi.org/10.3168/jds.2006-574>

- Mtango N.R., Potireddy S., Latham K.E. (2008) Oocyte quality and maternal control of development. *Int. Rev. Cell. Mol. Biol.* 268:223–290. [https://doi.org/10.1016/s1937-6448\(08\)00807-1](https://doi.org/10.1016/s1937-6448(08)00807-1)
- Mzedawee H.R.H., Kowsar R., Moradi-Hajidavaloo R., Shiasi-Sardoabi R., Sadeghi K., Nasr-Esfahani M.H., Hajian M. (2024) Heat shock interferes with the amino acid metabolism of bovine cumulus-oocyte complexes *in vitro*: a multistep analysis. *Amino acids* 56(1):2. <https://doi.org/10.1007/s00726-023-03370-6>
- Nabenishi H., Takagi S., Kamata H., Nishimoto T., Morita T., Ashizawa K., Tsuzuki Y. (2012) The role of mitochondrial transition pores on bovine oocyte competence after heat stress, as determined by effects of cyclosporin A. *Mol. Reprod. Dev.* 79(1):31–40. <https://doi.org/10.1002/mrd.21401>
- Nagy K., Szabadi N.T., Góczy E., Lázár B., Ecker A., Tóth A., Sándorová L., Stéger V., Tokár A., Gustavo D., Zomborszky Z., Bodó S. (2026) The Effect of Heat Treatment on the Gene Expression and Cryosurvival of *In vitro*-Produced Bovine Embryos. *Animals* 16(15):2289. <https://doi.org/10.3390/ani16152289>
- Naranjo-Gómez J.S., Uribe-García H.F., Herrera-Sánchez M.P., Lozano-Villegas K.J., Rodríguez-Hernández R., Rondón-Barragán I.S. (2021) Heat stress on cattle embryo: gene regulation and adaptation. *Heliyon* 7(3):e06570. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2021.e06570>
- Negrón-Pérez V., Fausnacht D., Rhoads M. (2019) Invited review: Management strategies capable of improving the reproductive performance of heat-stressed dairy cattle. *J. Dairy Sci.* 102(12):10695–10710. <https://doi.org/10.3168/jds.2019-16718>
- Nicacio A.C., Simões R., de Paula-Lopes F.F., de Barros F.R., Peres M.A., Assumpção M.E., Visintin J.A. (2012) Effects of different cryopreservation methods on post-thaw culture conditions of *in vitro* produced bovine embryos. *Zygote* 20(2):117–122. <https://doi.org/10.1017/S0967199410000717>
- Ofosu J., Zhang Y., Liu Y., Sun X., Quan G., Alvarez Rodriguez M., Zhou G. (2023) Editorial: Cryopreservation of Mammalian Gametes and Embryos: Implications of Oxidative and Nitrosative Stress and Potential Role of Antioxidants. *Front. Vet. Sci.* 10:1174756. <https://doi.org/10.3389/fvets.2023.1174756>
- O'Hara L., Forde N., Kelly A.K., Lonergan P. (2014) Effect of bovine blastocyst size at embryo transfer on day 7 on conceptus length on day 14: can supplementary progesterone rescue small embryos? *Theriogenology* 81(8):1123–1128. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2014.01.041>
- Oliveira C.P., Sousa F.C.d., Silva A.L.d., Schultz É.B., Valderrama Londoño R.I., Souza P.A.R.d. (2025) Heat Stress in Dairy Cows: Impacts, Identification, and Mitigation Strategies - A Review. *Animals*, 15(2):249. <https://doi.org/10.3390/ani15020249>
- Oliveira C.S., Marques S.C.S., Guedes P.H.E., Feuchard V.L., Camargo A.J.R., De Freitas C., Camargo L.S.A. (2021) Thermal Treatment Protocol to Induce Thermotolerance in Bovine Embryos. *Reprod. Fertil. Dev.* 33(7):497–501. <https://doi.org/10.1071/rd20309>

- Ouellet V., Boucher A., Dahl G.E., Laporta J. (2021) Consequences of Maternal Heat Stress at Different Stages of Embryonic and Fetal Development on Dairy Cows' Progeny. *Anim. Front.* 11(6):48–56. <https://doi.org/10.1093/af/vfab059>
- Pacheco V.M., Sousa R.V.d., Rodrigues A.V.d.S., Sardinha E.J.d.S., Martello L.S. (2020) Thermal Imaging Combined with Predictive Machine Learning Based Model for the Development of Thermal Stress Level Classifiers. *Livest. Sci.* 241:104244. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2020.104244>
- Park E.G., Ha H., Lee D.H., Kim W.R., Lee Y.J., Bae W.H., Kim H.S. (2022) Genomic Analyses of Non-Coding RNAs Over-lapping Transposable Elements and Its Implication to Human Diseases. *Int. J. Mol. Sci.* 23(16): 8950. <https://doi.org/10.3390/ijms23168950>
- Parrish J.J., Susko-Parrish J.L., Leibfried-Rutledge M.L., Critser E.S., Eyestone W.H., First N.L. (1986) Bovine *in vitro* fertilization with frozen-thawed semen. *Theriogenology* 25(4):591–600. [https://doi.org/10.1016/0093-691x\(86\)90143-3](https://doi.org/10.1016/0093-691x(86)90143-3)
- Pascottini O.B., Leroy J.L.M.R., Opsomer G. (2020) Metabolic Stress in the Transition Period of Dairy Cows: Focusing on the Prepartum Period. *Animals* 10(8):1419. <https://doi.org/10.3390/ani10081419>
- Pasquinelli A.E. (2012) MicroRNAs and Their Targets: Recognition, Regulation and an Emerging Reciprocal Relationship. *Nat. Rev. Genet.* 13(4)271–282. <https://doi.org/10.1038/nrg3162>
- Paula-Lopes F.F., Hansen P.J. (2002) Heat shock-induced apoptosis in preimplantation bovine embryos is a developmentally regulated phenomenon. *Biol. Reprod.* 66(4):1169–1177. <https://doi.org/10.1093/biolreprod/66.4.1169>
- Pérez-Gómez A., González-Brusi L., Bermejo-Álvarez P., Ramos-Ibeas P. (2021) Lineage Differentiation Markers as a Proxy for Embryo Viability in Farm Ungulates. *Front. Vet. Sci.* 8:680539. <https://doi.org/10.3389/fvets.2021.680539>
- Pero M.E., Zullo G., Esposito L., Iannuzzi A., Lombardi P., De Canditiis C., Neglia G., Gasparri B. (2018) Inhibition of apoptosis by caspase inhibitor Z-VAD-FMK improves cryotolerance of *in vitro* derived bovine embryos. *Theriogenology* 108:127–135. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2017.11.031>
- Pinto S., Hoffmann G., Ammon C., Amon T. (2020) Critical THI thresholds based on the physiological parameters of lactating dairy cows. *J. Therm. Biol.* 88:102523. <https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2020.102523>
- Ponter A.A., Guyader-Joly C., Nuttinck F., Grimard B., Humblot P. (2012) Oocyte and Embryo Production and Quality after OPU-IVF in Dairy Heifers given Diets Varying in Their n-6/n-3 Fatty Acid Ratio. *Theriogenology* 78(3):632–645. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2012.03.009>
- Pontes J.H.F., Silva K.C.F., Basso A.C., Rigo A.G., Ferreira C.R., Santos G.M.G., Sanches B.V., Porcionato J.P.F., Vieira P.H.S., Faifer F.S., Sterza F.A., Schenk J.L., Seneda M.M. (2010) Large-Scale *in vitro* Embryo Production and Pregnancy Rates from Bos Taurus, Bos Indicus, and Indicus-Taurus Dairy Cows Using Sexed Sperm. *Theriogenology* 74(8):1349–1355. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2010.06.004>

- Pustovaya K., Venediktov A., Soldatov V., Kuzmin E., Pokidova K., Gartzeva V., Payushina O., Tsytarev V., Meglinski I., Piavchenko G. (2026) Recent insights into HSP70: proteostasis and beyond. *Front. Mol. Biosci.* 13:1791536. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2026.1791536>
- Radons J. (2016) The human HSP70 family of chaperones: where do we stand? *Cell Stress Chaperones* 21(3):379–404. <https://doi.org/10.1007/s12192-016-0676-6>
- Ramos-Ibeas P., Lamas-Toranzo I., Martínez-Moro Á., de Frutos C., Quiroga A.C., Zurita E., Bermejo-Alvarez P. (2020) Embryonic disc formation following post-hatching bovine embryo development *in vitro*. *Reproduction* 160(4):579–589. <https://doi.org/10.1530/rep-20-0243>
- Ramos-Ibeas P., Pérez-Gómez A., González-Brusi L., Quiroga A.C., Bermejo-Álvarez P. (2023) Pre-hatching exposure to N2B27 medium improves post-hatching development of bovine embryos *in vitro*. *Theriogenology* 205:73–78. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2023.04.018>
- Rejeb M., Sadraoui R., Najar T., M'rad M.B. (2016) A Complex Interrelationship between Rectal Temperature and Dairy Cows' Performance under Heat Stress Conditions. *Open J. Anim. Sci.* 6(1):24–30. <https://doi.org/10.4236/ojas.2016.61004>
- Reynolds L.P., Vonnahme K.A. (2017) Livestock as Models for Developmental Programming. *Anim. Front.* 7(3):12–17. <https://doi.org/10.2527/af.2017-0123>
- Rhoads M.L. (2020) Effects of Periconceptional Heat Stress on Primiparous and Multiparous Daughters of Holstein Dairy Cows. *Theriogenology* 150:458–463. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2020.03.015>
- Ribeiro E.S., Gomes G., Greco L.F., Cerri R.L.A., Vieira-Neto A., Monteiro P.L.J., Lima F.S., Bisinotto R.S., Thatcher W.W., Santos J.E.P. (2016) Carryover Effect of Postpartum Inflammatory Diseases on Developmental Biology and Fertility in Lactating Dairy Cows. *J. Dairy Sci.* 99(3):2201–2220. <https://doi.org/10.3168/jds.2015-10337>
- Rio P.D., DiMarco S., Madan P. (2024) MicroRNAomic Analysis of Spent Media from Slow- and Fast-Growing Bovine Embryos Reveal Distinct Differences. *Animals* 14(16):2331. <https://doi.org/10.3390/ani14162331>
- Rivera R.M., Kelley K.L., Erdos G.W., Hansen P.J. (2003) Alterations in ultrastructural morphology of two-cell bovine embryos produced *in vitro* and *in vivo* following a physiologically relevant heat shock. *Biol. Reprod.* 69(6):2068–2077. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.103.020347>
- Rivera R.M., Kelley K.L., Erdos G.W., Hansen P.J. (2004) Reorganization of microfilaments and microtubules by thermal stress in two-cell bovine embryos. *Biol Reprod.* 70:1852–1862. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.103.024901>
- Rizos D., Ward F., Duffy P., Boland M.P., Lonergan P. (2002) Consequences of bovine oocyte maturation, fertilization or early embryo development *in vitro* versus *in vivo*: Implications for blastocyst yield and blastocyst quality. *Mol. Reprod. Dev.* 61(2):234–248. <https://doi.org/10.1002/mrd.1153>

- Rizos D., Clemente M., Bermejo-Alvarez P., De La Fuente J., Lonergan P., Gutiérrez-Adán A. (2008) Consequences of *in vitro* culture conditions on embryo development and quality. *Reprod Domest Anim.* 43(S4):44–50. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2008.01230.x>
- Roberts J.N., Byrem T.M., Grooms D.L. (2015) Application of an ELISA milk pregnancy test in beef cows. *Reprod. Domest. Anim.* 50(4):651–658. <https://doi.org/10.1111/rda.12546>
- Rodrigues C.A., Ayres H., Ferreira R.M., Teixeira A., Mancilha R.F., Oliveira M.E.F., Souza A.H., Baruselli P.S. (2007) Comparison of pregnancy rates after artificial insemination or embryo transfer in high producing repeat breeder Holstein cows. Annual meeting brazilian embryo technology society. *Acta Sci. Vet.* 35:1255. Utolsó letöltés dátuma: 2026.07.18. https://www.researchgate.net/publication/284777170_Comparison_of_pregnancy_rates_after_artificial_insemination_or_embryo_transfer_in_high-producing_repeat_breeder_Holstein_cows
- Rodrigues C.A., Teixeira A.A., Ferreira R.M., Ayres H., Mancilha R.F., Souza A.H., Baruselli P.S. (2010) Effect of fixed-time embryo transfer on reproductive efficiency in high-producing repeat-breeder Holstein cows. *Anim. Reprod. Sci.* 118(2-4):110–117. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2009.06.020>
- Roth Z., Meidan R., Braw-Tal R., Wolfenson D. (2000) Immediate and delayed effects of heat stress on follicular development and its association with plasma FSH and inhibin concentration in cows. *J. Reprod. Fertil.* 120(1):83–90. <https://doi.org/10.1530/reprod/120.1.83>
- Roth Z., Arav A., Bor A., Zeron Y., Braw-Tal R., Wolfenson D. (2001) Improvement of quality of oocytes collected in the autumn by enhanced removal of impaired follicles from previously heat-stressed cows. *Reproduction* 122(5):737–744. <https://doi.org/10.1530/rep.0.1220737>
- Roth Z., Hansen P.J. (2004) Sphingosine 1-phosphate protects bovine oocytes from heat shock during maturation. *Biol. Reprod.* 71(6):2072–2078. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.104.031989>
- Roth Z. (2017) Effect of heat stress on reproduction in dairy cows: insights into the cellular and molecular responses of the oocyte. *Annu. Rev. Anim. Biosci.* 5:151–170. <https://doi.org/10.1146/annurev-animal-022516-022849>
- Sakatani M., Kobayashi S., Takahashi M. (2004) Effects of heat shock on *in vitro* development and intracellular oxidative state of bovine preimplantation embryos. *Mol. Reprod. Dev.* 67(1):77–82. <https://doi.org/10.1002/mrd.20014>
- Sakatani M., Yamanaka K., Kobayashi S., Takahashi M. (2008) Heat shock-derived reactive oxygen species induce embryonic mortality in *in vitro* early stage bovine embryos. *J. Reprod. Dev.* 54(6):496–501. <https://doi.org/10.1262/jrd.20017>
- Sakatani M., Alvarez N.V., Takahashi M., Hansen P.J. (2012) Consequences of physiological heat shock beginning at the zygote stage on embryonic development and expression of stress response genes in cattle. *J. Dairy Sci.* 95(6):3080–3091. <https://doi.org/10.3168/jds.2011-4986>

- Sakatani M., Bonilla L., Dobbs K.B., Block J., Ozawa M., Shanker S., Yao J., Hansen P. J. (2013) Changes in the transcriptome of morula-stage bovine embryos caused by heat shock: relationship to developmental acquisition of thermotolerance. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 11:3. <https://doi.org/10.1186/1477-7827-11-3>
- Sakatani M. (2017) Effects of heat stress on bovine preimplantation embryos produced *in vitro*. *J. Reprod. Dev.* 63(4):347–352. <https://doi.org/10.1262/jrd.2017-045>
- Samali A., Orrenius S. (1998) Heat shock proteins: regulators of stress response and apoptosis. *Cell Stress Chaperones* 3(4):228–236. [https://doi.org/10.1379/1466-1268\(1998\)003<0228:hspros>2.3.co;2](https://doi.org/10.1379/1466-1268(1998)003<0228:hspros>2.3.co;2)
- Sammad A., Umer S., Shi R., Zhu H., Zhao X., Wang Y. (2020) Dairy Cow Reproduction under the Influence of Heat Stress. *J. Anim. Physiol. Nutr.* 104(4):978–986. <https://doi.org/10.1111/jpn.13257>
- Sanches B.V., Lunardelli P.A., Tannura J.H., Cardoso B.L., Pereira M.H., Gaitkoski D., Basso A.C., Arnold D.R., Seneda M.M. (2016) A new direct transfer protocol for cryopreserved IVF embryos. *Theriogenology* 85(6):1147–1151. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2015.11.029>
- Sawai K. (2021) Roles of cell differentiation factors in preimplantation development of domestic animals. *J. Reprod. Dev.* 67(3):161–165. <https://doi.org/10.1262/jrd.2021-031>
- Schüller L.K., Burfeind O., Heuwieser W. (2014) Impact of heat stress on conception rate of dairy cows in the moderate climate considering different temperature-humidity index thresholds, periods relative to breeding, and heat load indices. *Theriogenology* 81(8):1050–1057. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2014.01.029>
- Schüller L.K., Michaelis I., Heuwieser W. (2017) Impact of heat stress on estrus expression and follicle size in estrus under field conditions in dairy cows. *Theriogenology* 102:48–53. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2017.07.004>
- Sciorio R., Smith G.D. (2019) Embryo culture at a reduced oxygen concentration of 5%: a mini review. *Zygote* 27(6):355–361. <https://doi.org/10.1017/s0967199419000522>
- Sejian V., Bhatta R., Gaughan J.B., Dunshea F.R., Lacetera N. (2018) Review: Adaptation of animals to heat stress. *Animal* 12(s2):s431–s444. <https://doi.org/10.1017/s1751731118001945>
- Sengar G.S., Deb R., Singh U., Raja T.V., Kant R., Sajjanar B., Alex R., Alyethodi R.R., Kumar A., Kumar S., Singh R., Jakhesara S.J., Joshi C.G. (2018) Differential expression of microRNAs associated with thermal stress in Frieswal (Bos taurus x Bos indicus) crossbred dairy cattle. *Cell Stress Chaperones* 23(1):155–170. <https://doi.org/10.1007/s12192-017-0833-6>
- Serbetci I., González-Grajales L.A., Herrera C., Ibanescu I., Tekin M., Melean M., Magata F., Malama E., Bollwein H., Scarlet D. (2024) Impact of Negative Energy Balance and Postpartum Diseases during the Transition Period on Oocyte Quality and Embryonic Development in Dairy Cows. *Front. Vet. Sci.* 10:1328700. <https://doi.org/10.3389/fvets.2023.1328700>

- Shaleh I., Kim S.W., Park T.S., Park J. (2026) Mechanistic Understanding of Heat Stress in Cattle Reproduction toward Pharmacological Strategies: Review. *Anim. Biosci.* 39(4):250531. <https://doi.org/10.5713/ab.250531>
- Shi Y., Hu B., Wang Z., Wu X., Luo L., Li S., Wang S., Zhang K., Wang H. (2023) Functional role of GATA3 and CDX2 in lineage specification during bovine early embryonic development. *Reproduction* 165(3):325–333. <https://doi.org/10.1530/REP-22-0269>
- Shirley A.K., Thomson P.C., Chlingaryan A., Clark C.E.F. (2024) Review: Ruminant heat-stress terminology. *Animal* 18(9):101267. <https://doi.org/10.1016/j.animal.2024.101267>
- Sigdel A., Abdollahi-Arpanahi R., Aguilar I., Peñagaricano F. (2019) Whole genome mapping reveals novel genes and pathways involved in milk production under heat stress in US holstein cows. *Front. Genet.* 10:928. <https://doi.org/10.3389/fgene.2019.00928>
- Sonna L.A., Fujita J., Gaffin S.L., Lilly C.M. (2002) Invited Review: Effects of Heat and Cold Stress on Mammalian Gene Expression. *J. Appl. Physiol.* 92(4):1725–1742. <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.01143.2001>
- Soriani N., Panella G., Calamari L. (2013) Rumination time during the summer season and its relationships with metabolic conditions and milk production. *J. Dairy Sci.* 96(8):5082–5094. <https://doi.org/10.3168/jds.2013-6620>
- Sosa F., Ortega M.S. (2025) Selecting sires to improve reproductive success: key traits for enhanced fertility and embryo development. *Anim. Reprod.* 22(3):e20250052. <https://doi.org/10.1590/1984-3143-AR2025-0052>
- Souza V.D.G.P., Souza G.T., Lemos D.R., Guimarães J.M.O., Quintão C.C.R., Munk M., Saraiva N.Z., Camargo L.S.A. (2021) Heat shock during *in vitro* maturation of bovine oocytes disturbs bta-miR-19b and DROSHA transcripts abundance after *in vitro* fertilization. *Reprod. Domest. Anim.* 56(8):1128–1136. <https://doi.org/10.1111/rda.13956>
- Sovernigo T.C., Adona P.R., Monzani P.S., Guemra S., Barros F., Lopes F.G., Leal C. (2017) Effects of supplementation of medium with different antioxidants during *in vitro* maturation of bovine oocytes on subsequent embryo production. *Reprod. Domest. Anim.* 52(4):561–569. <https://doi.org/10.1111/rda.12946>
- Stamperna K., Giannoulis T., Nanas I., Kalemkeridou M., Dadouli K., Moutou K., Amiridis G.S., Dovolou E. (2020) Short Term Temperature Elevation during IVM Affects Embryo Yield and Alters Gene Expression Pattern in Oocytes, Cumulus Cells and Blastocysts in Cattle. *Theriogenology* 156:36–45. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2020.06.039>
- Stamperna K., Giannoulis T., Dovolou E., Kalemkeridou M., Nanas I., Dadouli K., Moutou K., Mamuris Z., Amiridis G.S. (2021a) The Effects of Heat Shock Protein 70 Addition in the Culture Medium on the Development and Quality of *In vitro* Produced Heat Shocked Bovine Embryos. *Animals* 11(12):3347. <https://doi.org/10.3390/ani11123347>
- Stamperna K., Dovolou E., Giannoulis T., Kalemkeridou M., Nanas I., Dadouli K., Moutou K., Mamuris Z., Amiridis G.S. (2021b) Developmental competence of heat stressed oocytes from Holstein and Limousine cows matured *in vitro*. *Reprod. Domest. Anim.* 56(10):1302–1314. <https://doi.org/10.1111/rda.13993>

- Stephens P.C., Edwards R.G., Purdy J.M. (1971) Human blastocysts grown in culture. *Nature* 229(5280):132–133. <https://doi.org/10.1038/229132a0>
- Stewart B.M., Block J., Morelli P., Navarette A.E., Amstalden M., Bonilla L., Hansen P.J., Bilby T.R. (2011) Efficacy of embryo transfer in lactating dairy cows during summer using fresh or vitrified embryos produced *in vitro* with sex-sorted semen. *J. Dairy Sci.* 94(7):3437–3445. <https://doi.org/10.3168/jds.2010-4008>
- Stinshoff H., Wilkening S., Hanstedt A., Brüning K., Wrenzycki C. (2011) Cryopreservation affects the quality of *in vitro* produced bovine embryos at the molecular level. *Theriogenology* 76(8):1433–1441. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2011.06.013>
- Sudano M.J., Paschoal D.M., da Silva Rascado T., Magalhães L.C.O., Crocomo L.F., de Lima-Neto J.F., da Cruz Landim-Alvarenga F. (2011) Lipid content and apoptosis of *in vitro*-produced bovine embryos as determinants of susceptibility to vitrification. *Theriogenology* 75(7):1211–1220. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2010.11.033>
- Sudano M.J., Marinho L.S.R., Costa C.B., Cancian R. (2016) Cryopreservation of Bovine Embryos. In: Seneda M.M., Silva-Santos K.C., Marinho L.S.R. (Ed.). *Biotechnology of Animal Reproduction*. Hauppauge, NY, USA: Nova Science Publishers. p.1–33. ISBN 978-1-63484-745-2. Utolsó letöltés dátuma: 2026.06.22. https://www.researchgate.net/publication/317761049_Cryopreservation_of_bovine_embryos
- Tervit H.R., Whittingham D.G., Rowson L.E.A. (1972) Successful culture *in vitro* of sheep and cattle ova. *J. Reprod. Fertil.* 30(3):493–497. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0300493>
- Thundathil J., Dance A., Johnson C., Kastelic J. (2022) Efficiency of Repeated Superstimulations on Ovum Pick-up and *in vitro* Production (OPU-IVP) of Cattle Embryos and Donor Health. In: *Proceedings of the 19th International Congress on Animal Reproduction*, Bologna, Italy, 26–30 June 2022. Utolsó letöltés dátuma: 2026.06.08. https://www.researchgate.net/publication/361750669_abstractbook_ICAR_20222_Bologna_Italy_26th30th_June_2022_19th_International_Congress_on_Animal_Reproduction
- Török Z., Pilbat A.-M., Gombos I., Hocsák E., Sümegi B., Horváth I., Vígh L. (2012) Evidence on Cholesterol-Controlled Lipid Raft Interaction of the Small Heat Shock Protein HSPB11. *Springer Netherlands*. https://doi.org/10.1007/978-94-007-4740-1_5
- Tresoldi G., Hejazi M., Tucker C.B. (2025) A comprehensive study of respiration rates in dairy cattle in a Mediterranean climate. *J. Dairy Sci.* 108(6):6229–6243. <https://doi.org/10.3168/jds.2024-26038>
- Vajta G., Alexopoulos N.I., Callesen H. (2004) Rapid growth and elongation of bovine blastocysts *in vitro* in a three-dimensional gel system. *Theriogenology* 62(7):1253–1263. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2004.01.007>
- Varnosfaderani S., Hajian M., Jafarpour F., Ghazvini Zadegan F., Nasr-Esfahani M.H. (2020) Granulosa Secreted Factors Improve the Developmental Competence of Cumulus Oocyte Complexes from Small Antral Follicles in Sheep. *PLoS ONE* 15(3):e0229043. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0229043>

- Velazquez M.A. (2023) Nutritional Strategies to Promote Bovine Oocyte Quality for *In vitro* Embryo Production: Do They Really Work? *Vet. Sci.* 10(10):604. <https://doi.org/10.3390/vetsci10100604>
- Viana J.H.M. (2025) 2024 Statistics of embryo production and transfer in domestic farm animals. *IETS Embryo Technology Newsletter* 43:4. Utolsó letöltés dátuma: 2026.07.05. https://www.iets.org/Portals/0/Documents/Public/Committees/DRC/IETS_Data_Retrieval_Report_2024.pdf
- Vieira L.M., Rodrigues C.A., Mendanha M.F., Sá Filho M.F., Sales J.N., Souza A.H., Santos J.E., Baruselli P.S. (2014) Donor category and seasonal climate associated with embryo production and survival in multiple ovulation and embryo transfer programs in Holstein cattle. *Theriogenology* 82(2):204–212. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2014.03.018>
- Vitali A., Grossi G., Lacetera N. (2023) Vaginal temperature of lactating cows during heat waves or normal summer day and effect of additional daily cooling treatments as heat load mitigation strategy. *Int. J. Biometeorol.* 68:419–426. <https://doi.org/10.1007/s00484-023-02600-6>
- Wang X., Hongding G., Gebremedhin K.G., Schmidt Bjerg B., Van Os J., Tucker C.B., Zhang G. (2018) A predictive model of equivalent temperature index for dairy cattle (ETIC). *J. Therm. Biol.* 76:165–170. <https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2018.07.013>
- Ward F., Enright B., Rizos D., Boland M., Lonergan P. (2002) Optimization of *in vitro* bovine embryo production: effect of duration of maturation, length of gamete co-incubation, sperm concentration and sire. *Theriogenology* 57(8):2105–2117. [https://doi.org/10.1016/s0093-691x\(02\)00696-9](https://doi.org/10.1016/s0093-691x(02)00696-9)
- Watanabe Y.F., Souza H.A., Mingoti R.D., Ferreira R.M., Batista E.O.S., Dayan A., Watanabe O.Y., Meirelles F.V., Nogueira M.F.G., Ferraz J.B.S., Baruselli S. (2017) Number of Oocytes Retrieved per Donor during OPU and Its Relationship with *in vitro* Embryo Production and Field Fertility Following Embryo Transfer. *Anim. Reprod.* 14(3):635–644. <https://doi.org/10.21451/1984-3143-ar1008>
- Watson A.J. (2007) Oocyte cytoplasmic maturation: a key mediator of oocyte and embryo developmental competence. *J. Anim. Sci.* 85(S13):E1–E3. <https://doi.org/10.2527/jas.2006-432>
- Wei Q., Zhong L., Zhang S., Mu H., Xiang J., Yue L., Dai Y., Han J. (2017) Bovine Lineage Specification Revealed by Single-Cell Gene Expression Analysis from Zygote to Blastocyst. *Biol. Reprod.* 97(1):5–17. <https://doi.org/10.1093/biolre/iox071>
- Weller J.I., Ezra E., Gershoni M. (2021) Broad phenotypic impact of the effects of transgenerational heat stress in dairy cattle: a study of four consecutive generations. *Genet. Sel. Evol.* 53(1):69. <https://doi.org/10.1186/s12711-021-00666-7>
- Wijffels G., Sullivan M., Gaughan J. (2021) Methods to quantify heat stress in ruminants: Current status and future prospects. *Methods* 186:3–13. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2020.09.004>

- Wiltbank M., Lopez H., Sartori R., Sangsritavong S., Gümen A. (2006) Changes in Reproductive Physiology of Lactating Dairy Cows Due to Elevated Steroid Metabolism. *Theriogenology* 65(1):17–29. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2005.10.003>
- Wolfenson D., Roth Z., Meidan R. (2000) Impaired reproduction in heat-stressed cattle: basic and applied aspects. *Anim. Reprod. Sci.* 60–61:535–547. [https://doi.org/10.1016/s0378-4320\(00\)00102-0](https://doi.org/10.1016/s0378-4320(00)00102-0)
- Wolfenson D., Roth Z. (2018) Impact of heat stress on cow reproduction and fertility. *Anim. Front.* 9(1):32–38. <https://doi.org/10.1093/af/vfy027>
- Wooldridge L.K., Nardi M.E., Ealy A.D. (2019) Zinc supplementation during *in vitro* embryo culture increases inner cell mass and total cell numbers in bovine blastocysts. *J. Anim. Sci.* 97(12):4946–4950. <https://doi.org/10.1093/jas/skz351>
- Wrenzycki C. (2016) *In vitro* culture systems: how far are we from optimal conditions? *Anim. Reprod.* 13(3):279–282. <https://doi.org/10.21451/1984-3143-AR869>
- Wrzecińska M., Kowalczyk A., Kordan W., Cwynar P., Czerniawska-Piątkowska E. (2023) Disorder of Biological Quality and Autophagy Process in Bovine Oocytes Exposed to Heat Stress and the Effectiveness of *In vitro* Fertilization. *Int. J. Mol. Sci.* 24(13):11164. <https://doi.org/10.3390/ijms241311164>
- Yan G., Li H., Shi, Z. (2021) Evaluation of Thermal Indices as the Indicators of Heat Stress in Dairy Cows in a Temperate Climate. *Animals* 11(8):2459. <https://doi.org/10.3390/ani11082459>
- Yanagimachi R. (1994) Mammalian fertilization. In: Knobil E., Neill J. (Ed.) *The Physiology of Reproduction 2nd Edition*. NY. Raven Press. p. 189–317. ISBN 0-7817-0086-8. Utolsó letöltés dátuma: 2026.06.24. <https://dokumen.pub/the-physiology-of-reproduction-1-1nbnspe-0881672815-9780881672817.html>
- Yang X., He H., Wang P., Wang Y., Wang L., Yang F., Li J., Zhang H. (2025) Role of MiRNAs in Bovine Oocyte Maturation and Reproductive Regulation. *Int. J. Mol. Sci.* 26(7):2828. <https://doi.org/10.3390/ijms26072828>
- Zhao B., Li H., Zhang H., Lan X., Ren X., Zhang L., Ma H., Zhang Y., Wang Y. (2024) Inhibition of HSP90AA1 Induces Abnormalities in Bovine Oocyte Maturation and Embryonic Development. *Reproduction* 167(5):e230411. <https://doi.org/10.1530/rep-23-0411>
- Zimbelman R.B., Collier R.J. (2011) Feeding strategies for high-producing dairy cows during periods of elevated heat and humidity. *Proceedings of the 20th Annual Tri-State Dairy Nutrition Conference* 19-20 April, Fort Wayne, Indiana, USA, p. 111–125. Utolsó letöltés dátuma: 2026.07.09. <https://api.semanticscholar.org/CorpusID:25534609>

11. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Őszintén hálás vagyok témavezetőmnek, **Dr. Gócza Elennek**, a vizsgálatok tervezése, kiértékelése és publikálása során nyújtott szakmai, tudományos segítségéért és támogatásáért, valamint mentoromnak és csoportvezetőmnek, **Dr. Bodó Szilárdnak**, aki sokszor erején felül segített mindenben. Köszönettel tartozom társ-témavezetőmnek, **Dr. Zomborszky Zoltánnak** az állategészségügyi munkában és publikációban való támogatásért, emellett az embriológia iránti érdeklődésemért, hiszen megkeresésére kezdtem a Kaposvári Campus Embrió-átültető Központjában dolgozni.

Köszönetemet fejezem ki **Dr. Posta Katalinnak**, **Dr. Stéger Viktornak** és **Dr. Gócza Elennek**, hogy 2023 és 2025 között a Genetika és Biotechnológia Intézetben helyet és lehetőséget biztosítottak laboratóriumunk kialakításához és működtetéséhez. Külön köszönettel tartozom **Dr. Bodó Szilárdnak**, hogy 2025 második felétől lehetővé tette kísérleteim folytatását a Haszonállat Biotechnológiai Oktatási és Kutatási Központ Haszonállat Embriológiai Laboratóriumában, a Szaporodásbiológiai, Embriológiai és Génmegőrzési Kutatócsoport szakmai támogatásával. Emellett hálásan köszönöm **Dr. Póti Péternek** a sok segítséget, amellyel lehetővé tette, hogy Gödöllőn folytathassam munkámat.

Hálásan köszönöm **Dr. Szabari Miklósnak**, aki a kísérlethez szükséges eszközöket rendelkezésünkre bocsátotta, és végig támogatott a képzés során. Hálás vagyok **Dr. Áprily Szilvia** Intézetigazgató Asszonynak, aki engedélyezte az eszközök használatát a kutatás befejeztéig.

Szeretném köszönetemet kifejezni **Prof. Dr. Szabó Andrásnak** a doktori képzésben való részvétel lehetőségéért és az iránymutatásért, illetve **Laczkó Lórándnének** a sok segítségért.

Köszönettel tartozom az Állatbiotechnológia Tanszék munkatársainak, különösen **Tokodyné Dr. Szabadi Nikolettnek**, aki a génexpressziós vizsgálatok elvégzésében nyújtott nélkülözhetetlen segítséget, **Dr. Lázár Bencének**, aki statisztikai gyakorlati tanácsokkal látott el munkám során, illetve segítette a fluoreszcens mikroszkópiával való munkát, valamint **Tóth Arnoldnak**, aki az apoptózis- és nekrozisfestés során nyújtott segítséget. Hálával tartozom **Dr. Stéger Viktornak**, akihez bármilyen kérdéssel fordulhattam és a disszertációm elkészítésében is segítséget nyújtott. Emellett hálásan köszönöm munkatársaimnak, **Sándorová Lillának** és **Tokár Alexandrának** a kísérletekben való sok segítséget és a kölcsönös támogatást úgy a munkánk során, mint a magánéletünkben. Köszönetemet szeretném még kifejezni **Jakab Juditnak**, aki megtanított az embrió-előállítás alapjaira, és őszinteségével, támogatásával mindig mellettem állt, **Dr. Fehér Péter Árpádnak**, aki minden felmerülő problémát igyekezett velünk megoldani, illetve

a Precíziós Állattenyésztési és Állattenyésztési Biotechnika Tanszék munkatársainak, akik bármilyen formában támogattak munkám során.

Rendkívül hálás vagyok férjemnek, **Al-Husseini Ahmednek** és gyermekünknek, **Al-Husseini Abdullah Ádámnak** a doktori munkámban való fizikai és lelki támogatásért, a sok bátorításért és a végtelen türelemért, Édesanyámnak, **Gyenis Máriának** és Édesapámnak, **Nagy Tibor Lajosnak**, illetve nagyapámnak, **Gyenis Imrének**, akik szeretetükkel és bizalmukkal mindig támogattak a tanulmányaim során. Hálásan köszönöm továbbá Irakban élő családomnak - **Abdalrazaq Al-Husseini, Nawal Ibrahim Al-Douri, Rabiaa Al-Husseini, Rawaa Al-Husseini, Bilal Al-Husseini, Sara Hussein, Ghaith Al-Husseini** - a sok törődést és motivációt.

A kísérleti munka megvalósítását az NKFIH 2020-1.1.2-PIACI-KFI-2021-00305 „Táplálkozásfiziológiai szempontból széleskörűen akceptált ipari tej előállítását támogató technológiák fejlesztése molekuláris biológiai eszközökkel”, valamint a 2020-1.1.2-PIACI-KFI-2021-00333 „Állatjóléti szempontból optimalizált petesejt-kinyerési technikák és embrió-előállítás fejlesztése kereskedelmi célú gaméta- és embrióbank kialakításához” konzorciális pályázatok támogatták.



Jelen disszertációt szeretett nagymamám, Gyenis Imréné Barna Katalin tiszteletére ajánlom, akinek szeretete és támogatása végigkíséri életemet.

Drága emléke örökké bennünk él.



12. PUBLIKÁCIÓS LISTA

A disszertáció témakörében megjelent publikációk

Idegen nyelvű cikk tudományos folyóiratban

Nagy K., Szabadi N.T., Gócza E., Lázár B., Ecker A., Tóth A., Sándorová L., Stéger V., Tokár A., Gustavo D., Zomborszky Z., Bodó S. (2026) The Effect of Heat Treatment on the Gene Expression and Cryosurvival of *In vitro*-Produced Bovine Embryos. *Animals* 16(15):2289. <https://doi.org/10.3390/ani16152289>
D1–Q1

Magyar nyelvű cikk tudományos folyóiratban

Nagy K., Egerszegi I., Gócza E., Zomborszky Z., Bodó Sz., Tokár A., Szabari M. (2026) A hőstressz hatása a kérődzők reprodukciójára. *MÁL* 148:339–350
<https://doi.org/10.56385/magyallov.2026.6.339-350>
Q2

Nagy K., Tokár A., Sándorová L., Gócza E., Zomborszky Z., Stéger V., Szabari M., Póti P., Bodó Sz. (2025) Szarvasmarha *in vitro* embrió-előállító rendszer létrehozása kutatási modellkísérletek számára - módszertani ismertető. *AWETH* 21:86–93.

Nemzetközi és hazai konferenciakiadványban teljes terjedelemben megjelent anyag (proceeding)

Nagy K., Jakab J., Zomborszky Z., Gócza E. (2023) A hőstressz hatása az *in vivo* módon előállított szarvasmarha embriók minőségére. In: XXIX. Ifjúsági Tudományos Fórum Keszthely, Konferenciakötet ISBN: 978-615-6338-08-2 (pdf).

Nagy K., Jakab J., Zomborszky Z., Gócza E. (2023) A hőstressz hatása az *in vivo* előállított szarvasmarha embriók minőségére. In: Magyar Buiatrikus Társaság XXXI. Nemzetközi Tudományos Kongresszusa Keszthely, Konferenciakötet ISBN: 978-615-8141-3-3-8, 177–182.

Nagy K., Hussamaldin A., Gustavo D., Sándorová L., Bodó Sz. (2025) Mikrocseppes inkubációs rendszer optimalizálása szarvasmarha petesejtek érlelése és embriók tenyésztése során. In: Szenci O., Brydl E. Magyar Buiatrikus Társaság XXXIII. Nemzetközi Tudományos Kongresszusa, Tapolca, 157–163.

Nemzetközi és hazai konferenciakiadványban megjelent abstract (magyar és angol nyelvű)

- Nagy K.,** Jakab J., Zomborszky Z., Gócza E. (2023) A hőstressz hatása az *in vivo* és *in vitro* módon előállított szarvasmarha embriók minőségére és életképességére. In: 27. Szaporodásbiológiai Találkozó Székesfehérvár, Konferenciakötet, p. 25.
- Nagy K.,** Jakab J., Zomborszky Z., Gócza E. (2023) Az *in vivo* módon előállított szarvasmarha embriók minőségének változása a hőstressz hatására. In: 28. Szaporodásbiológiai Találkozó Szarvas, Konferenciakötet, p. 29.
- Nagy K.,** Jakab J., Pósa R., Zomborszky Z., Gócza E. (2024) A hőstressz hatása az embrióátültetés sikerességére. In: DOSZxMABE Biotechnológiai szakmai nap Szeged Absztraktkötet ISBN: 978-615-6457-44-8, 21–22.
- Nagy K.,** Jakab J., Pósa R., Zomborszky Z., Gócza E. (2024) How heat stress affects the success of embryo transfer. In: 6th National Conference of Young Biotechnologists Martonvásár, Program and Abstracts ISBN: 978-615-6448-45-3, p. 107.
- Nagy K.,** Tokár A., Sándorová L., Gócza E., Stéger V., Szabari M., Póti P., Bodó Sz. (2024) Szarvasmarha *in vitro* embrió-előállító rendszer létrehozása kutatási modellkísérletek számára = Establishment of a bovine *in vitro* embryo production system for research model experiments. In: Bényi E., Bodnár Á., Pajor F., Póti P. IX. Gödöllői Állattenyésztési Tudományos Nap: Előadások és poszterek összefoglaló kötete, Gödöllő, MATE, 24–25.
- Nagy K.,** Tóth R., Salinas M., Sándorová L., Bodó Sz., Gócza E. (2025) *In vitro* előállított, hőkondicionált szarvasmarha embriók génexpressziós vizsgálata. In: 30. Szaporodásbiológiai Találkozó - Program – Összefoglalók, p. 19.

Kutatási témán kívüli publikációk

Idegen nyelvű cikk tudományos folyóiratban

Sándorová L., Fehér P.Á., Ambagan A.C., **Nagy K.**, Szabari M.G., Áprily S., Bodó S., Bodnár Á., Póti P., Pajor F., Holló G., Stéger V. (2026) Rapid Direct CSN2 Genotyping by PCR and Its Application in Population Genetics and A2 Milk Selection in Holstein Cattle. *Dairy* 7(1):12. <https://doi.org/10.3390/dairy7010012>
Q1

Sándorová L., **Nagy K.**, Bodó S., Bodnár Á., Egerszegi I., Fodor D., Pajor F., Stéger V. (2026) Embryo-Derived Sample Categories Show Differing Assay Evaluability and Apparent MSY-Classification Patterns in a Low-Input Bovine Embryo PCR Workflow. *Ruminants* 6(3):55. <https://doi.org/10.3390/ruminants6030055>
Q2

Magyar nyelvű cikk tudományos folyóiratban

Nagy K., Kovács L., Tornyos G., Szenci O. (2022) Új, alternatív terápiás módszerek a tüdőgyulladások kezelésére. *MÁL* 144:579–590.
Q4

Nemzetközi és hazai konferenciakiadványban teljes terjedelemben megjelent anyag (proceeding)

Nagy K., Tornyos G., Szenci O. (2022) Új alternatív terápiás módszerek keresése a tüdőgyulladások kezelésére. In: Magyar Buiatrikus Társaság XXX. Jubileumi Kongresszusa Eger, Konferenciakötet ISBN: 978-615-814113-2-1, 45–50.

Gustavo D., **Nagy K.**, Hussamaldin A., Tokár A., Sándorová L., Bodó Sz. (2025) Effect of the *in vitro* maturation conditions on oocyte competence. In: Bene, Sz. XXXI. Ifjúsági Tudományos Fórum. Keszthely, Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem Georgikon Campus, 26–31.

Hussamaldin A., Bodó Sz., Gustavo D., Sándorová L., **Nagy K.** (2025) The Effect of microdroplet culture following embryonic genome activation on embryo development. In: Bene Sz. XXXI. Ifjúsági Tudományos Fórum. Keszthely, Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem Georgikon Campus, 14–18.

Hazai konferenciakiadványban megjelent abstract (magyar és angol nyelvű)

Gustavo D., **Nagy K.**, Tokár A., Nagy Sz.T., Bodó Sz. (2025) Effect of the *in vitro* maturation conditions on oocyte competence. In: 30. SZAPORODÁSBIOLOGIAI TALÁLKOZÓ - Program - Összefoglalók, p. 25.

Hallgatók, doktoranduszok nyilatkozata mesterséges intelligencia (MI) alkalmazásáról

1. Általános adatok

Hallgató neve:	Nagy Katalin
Neptun-kódja:	FWZATW
Képzési szint (a megfelelőt jelölje X-szel):	☐ BSc/BA ☐ MSc/MA ☒ Doktori (PhD) ☐ Egyéb:
Tantárgy neve/kódja*:	
A munka címe:	<i>In vitro</i> előállított, hőstressznek kitétt szarvasmarha embriók molekuláris karakterizálása

* doktori értekezés esetén nem kitöltendő

2. Nyilatkozat az MI használatáról

Alulírott, etikai felelősségem teljes tudatában az alábbi nyilatkozatot teszem:

(Kérjük, válasszon egyet az alábbi lehetőségek közül!)

☐ A) Nem alkalmaztam mesterséges intelligencia rendszert vagy szolgáltatást.

(Amennyiben ezt jelölte, a további táblázatok kitöltése nem szükséges.)

☒ B) Alkalmaztam mesterséges intelligencia rendszert vagy szolgáltatást.

(Kérjük, töltsse ki a vonatkozó táblázatokat!)

3. A mesterséges intelligencia használatának részletezése

I. TÁBLÁZAT: Asszisztensi vagy kisebb mértékű felhasználás (pl. fordítás, nyelvi korrektúra, ötletelés stb.)

(Ezen felhasználások esetében a konkrét promptok és válaszok csatolása nem szükséges.)

A felhasználás célja	Alkalmazott MI-eszköz neve és verziója	Érintett rész (ha nem a szöveg egészére vonatkozik)
nyelvi korrektúra; fordítás; statisztikai módszertani konzultáció; szakirodalom keresésének támogatása	OpenAI ChatGPT – 5.6	

II. TÁBLÁZAT: Jelentős tartalmi hozzájárulás (pl. egy teljes ábra vagy egy hosszabb szövegrész generálása)

(Ezekben az esetekben a felhasznált kulcsfontosságú promptok és az MI által adott nyers válaszok dokumentálása és a munka mellékletében való csatolása szükséges.)

A felhasználás célja	Alkalmazott eszköz verziója, elérhetősége	MI- neve,	Az érintett fejezet / ábra / táblázat pontos sorszáma	A prompt-naplót tartalmazó melléklet bejegyzésének sorszáma

3/A. Oktató által előírt kiegészítő szabályok (ha vannak)

Amennyiben az adott tantárgy oktatója vagy témavezetője az MI-eszközök használatára vonatkozóan külön szabályokat vagy elvárásokat határozott meg, kérjük, az alábbi mezőben foglalja össze ezeket:

Pl. az MI használatának tilalma bizonyos feladattípusokra; csak konkrét eszköz használata engedélyezett; eltérő hivatkozási elvárások; dokumentációs forma stb.

Oktató vagy témavezető által előírt szabályok:

.....

.....

.....

.....

4. Minden hallgatóra vonatkozó nyilatkozat:

Kijelentem, hogy az MI által esetlegesen generált tartalmakat minden esetben kritikailag felülvizsgáltam, szerkesztettem és a munkába illesztettem. A leadott munka minden eleméért, annak eredetiségéért és tudományos helytállóságáért teljes körű felelősséget vállalok. Tudomásul veszem, hogy a Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem a benyújtott munkát mesterséges intelligencia detektorral ellenőrizheti, és eljárást kezdeményezhet, amennyiben a nyilatkozatom valótlan vagy hiányos.

Kelt: Gödöllő, 2026. szeptember 12.

.....
Nagy Katalin

Hallgató aláírása

.....
Gábor

Konzulens/Témavezető aláírása