

DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

NAGY KATALIN
KAPOSVÁRI CAMPUS
2026



MAGYAR AGRÁR- ÉS ÉLETTUDOMÁNYI EGYETEM

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

Nagy Katalin

Kaposvár

2026

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

1. A MUNKA ELŐZMÉNYEI

Az éghajlatváltozás következtében egyre gyakoribbá és intenzívebbé váló szélsőséges időjárási események jelentős kihívást jelentenek az állattenyésztés számára. A szarvasmarha-ágazatot 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 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.

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. 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 blasztocishta stádium eléréséig tart, ezért a később jelentkező fejlődési változások és az embriók hosszabb távú életképessége a rutinszerű tenyésztési rendszerekben csak korlátozottan vizsgálható. A blasztocishta 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.

2. CÉLKITŰZÉSEK

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

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 választ: 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. ANYAG ÉS MÓDSZER

3.1. *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-SEMPREP és BO-IVC. A folyamat minden lépését 38,8 °C-ra felmelegített médiumokkal és fűtött tárgyasztalon végeztük.

3.1.1. Petefészkek gyűjtése

Az *in vitro* embrió-előállításhoz szükséges petefészkeket a gyöngyösi Tendon Kft. szarvasmarha-vágóhidjáról 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. 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.

3.1.2. 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. 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. 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 ekvibrált, 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. 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 érlelődények használatát az egyes kísérletek kivitelezésekor rendelkezésre álló laboratóriumi infrastruktúra indokolta. A különböző IVM-rendszereket és érlelődényeket nem vizsgáltuk önálló kísérleti tényezőként.

3.1.3. *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. A termékenyítéshez cseppenként legfeljebb 40 petesejtet helyeztem el.

Az *in vitro* termékenyítéshez felhasznált sperma a petefészek-donorokkal azonos fajtájú, Holstein-fríz tenyész bikától 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 spermaminták motilitását Makler-kamrában (Sefi Medical Instruments Ltd., Haifa, Izrael), Olympus BX43 típusú binokuláris mikroszkóppal (Olympus Corporation, Tokyo, Japán), szubjektív becsléssel értékeltük. Az *in vitro* fertilizációhoz legalább 40%-os motilitású spermamintákat fogadtunk el; a felhasznált minták motilitása általában 40–50% között alakult. 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).

3.1.4. *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 ekvilibráció céljából.

A kumuluszsejtek eltávolításához – denudáláshoz – vortex kezelést alkalmaztunk. Ezután az előzőleg ekvilibrált 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.

3.2. 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 embriót tenyésztettem.

3.2.1. „A” kísérlet – Friss embriók vizsgálata

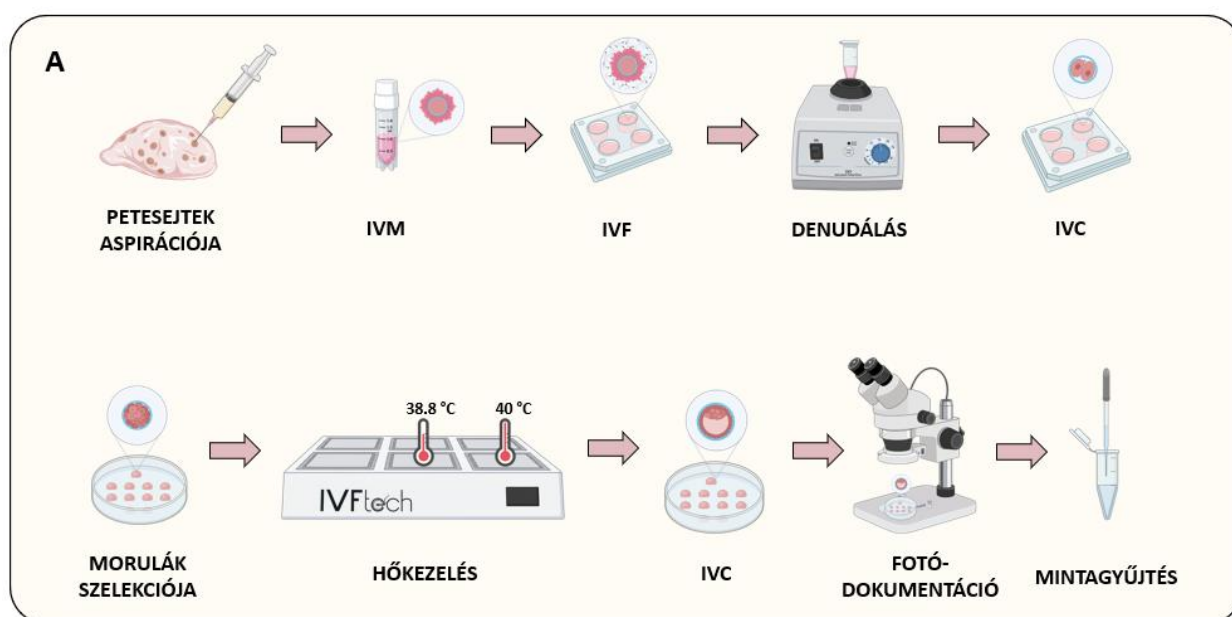
A kísérlet során öt korai morula stádiumú embriót helyeztem minden BO-IVC médiumcseppbe, amelyeket 35 mm-es Petri-csészékben ásványi olajjal fedtem le és az embriók behelyezése előtt két órán át ekvilibráltam az embriótenyésztés során alkalmazott körülmények között. A kísérlet során az inkubátor két 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 ismételés 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 párásító rendszerrel, így a párásításból 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 tenyésztőedényét is a hőkezelési kamrába helyeztem, majd mindkét csoport embrióit két órán át 40,0 °C-on inkubáltam. A kétórás inkubációt követően a hősokkcsoporthoz tenyésztőedényét 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 ismétlésben végeztem el. Az „A” kísérlet során összesen 270 korai morula stádiumú embrió volt a vizsgálatban. Az embriókat egyenlő arányban osztottuk el a kontroll, hőkezelt és hősokknak kitett csoportok között (csoportonként n = 90), három ismétlésben. A kísérletbe bevont embriók számát az 1. táblázatban foglaltam össze.

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 az 1. ábra szemlélteti.



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

3.2.2. „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 hősokkknak kitett embriók génexpressziós válasza rendkívül nagy egyedi variabilitást mutatott, ami a csoport eredményeinek értelmezhetőségét korlátozta. A blasztociszta stádium elérését követően az embriókat lassú fagyasztást alkalmazva krioprezervációnak vettem 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 $-6,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ -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 $0,5\text{ }^{\circ}\text{C}/30$ másodperc sebességgel $-34,3\text{ }^{\circ}\text{C}$ -ra csökkent. Amikor a hőmérséklet elérte a kívánt értéket, az embriókat tíz percen át a kamrában tartottam, majd gyors mozdulattal cseppfolyós nitrogénbe helyeztem.

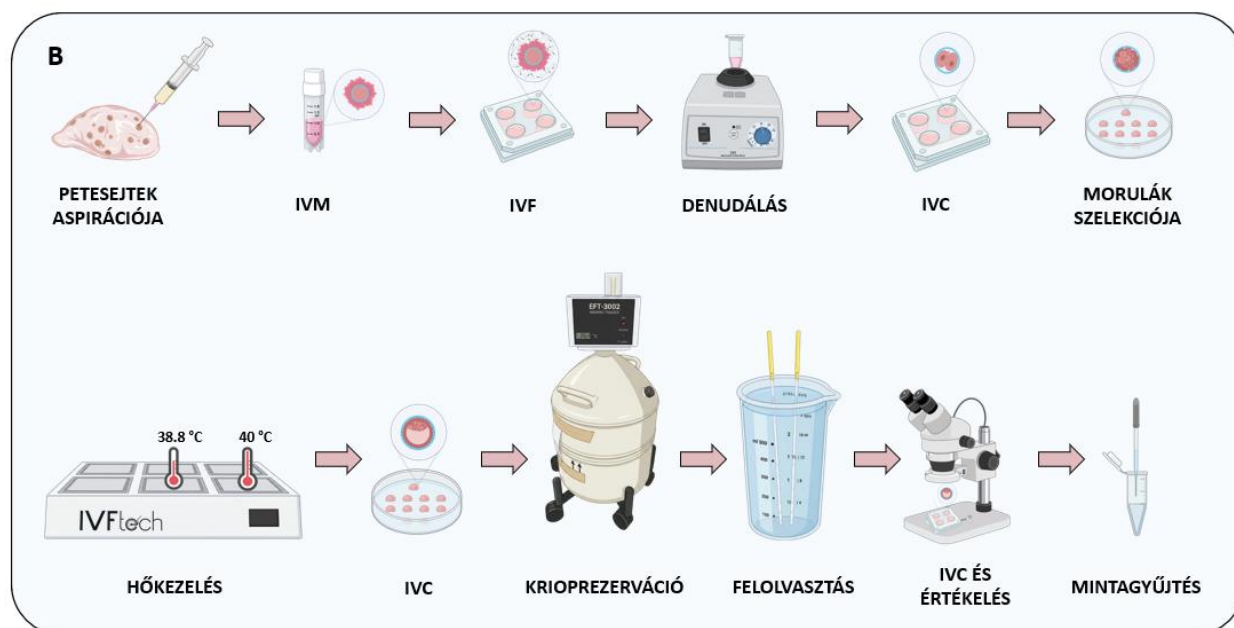
Az embriókat felolvasztásig cseppfolyós nitrogénben, $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on tároltam. A felolvasztás során az embriókat tartalmazó műszalmákat 30 másodpercig $37,8\text{ }^{\circ}\text{C}$ -ra melegített vízfürdőbe helyeztem, majd azok tartalmát 35 mm átmérőjű Petri-csészékbe ürítettem. Az 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 64 blasztocisztát vontunk be a mélyhűtési vizsgálatokba, 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 2. ábra szemlélteti.

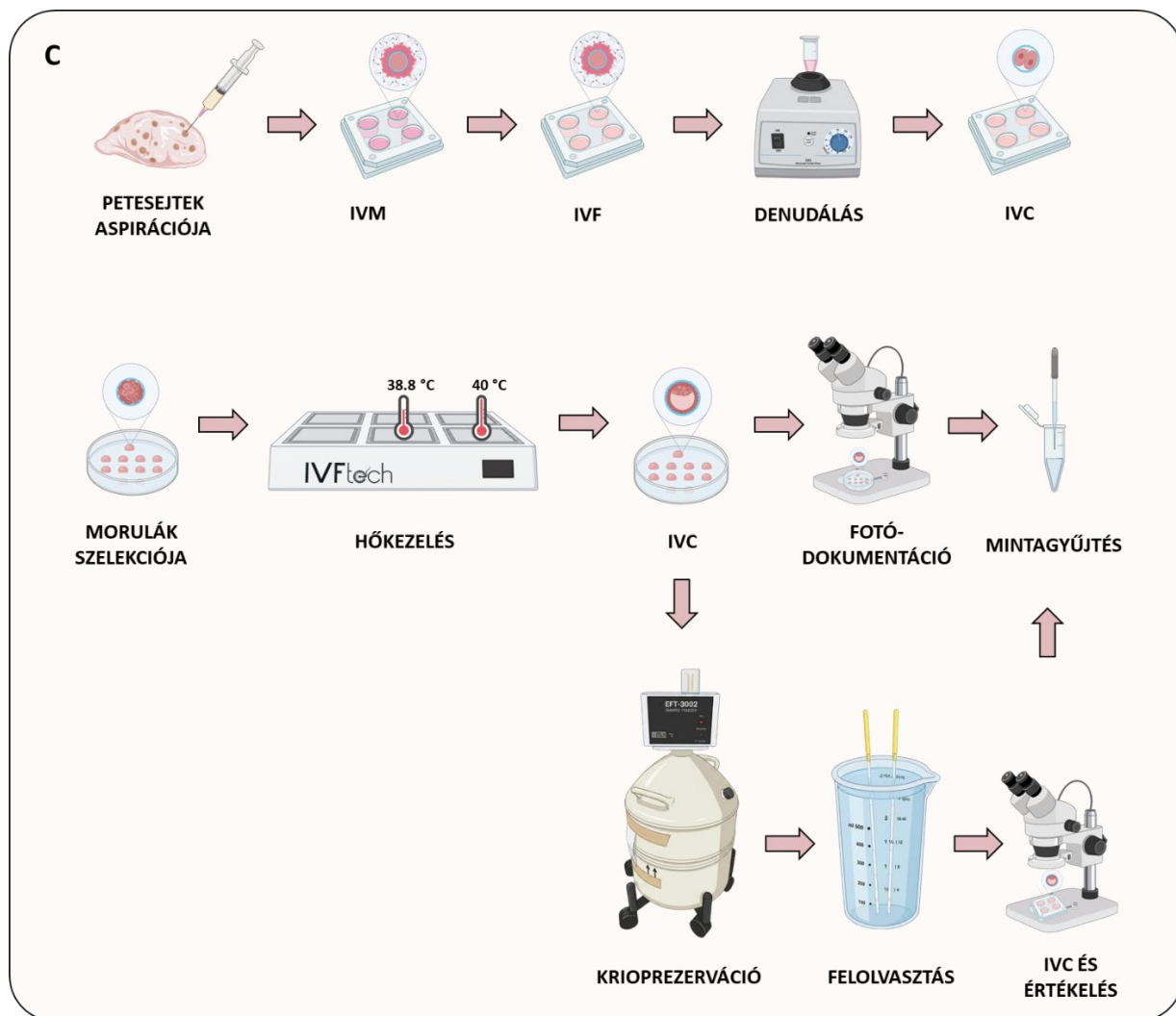


2. ábra. A „B” kísérlet munkafolyamatainak sematikus ábrázolása

3.2.3. „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. A vizsgálatot 3 biológiai ismételtesben végeztem el, ismételtesenként $n = 160$, összesen 480 korai morula stádiumú embriót bevonva, amelyeket egyenlő arányban osztottam el a kontroll- (K) és a hőkezelt (HK) csoportok között (csoportonként és biológiai ismételtesenként $n = 80$).

A hőkezélést 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 3. ábra szemlélteti.



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

3.2.4. „D” kísérlet – Prolongált embriótenyésztés

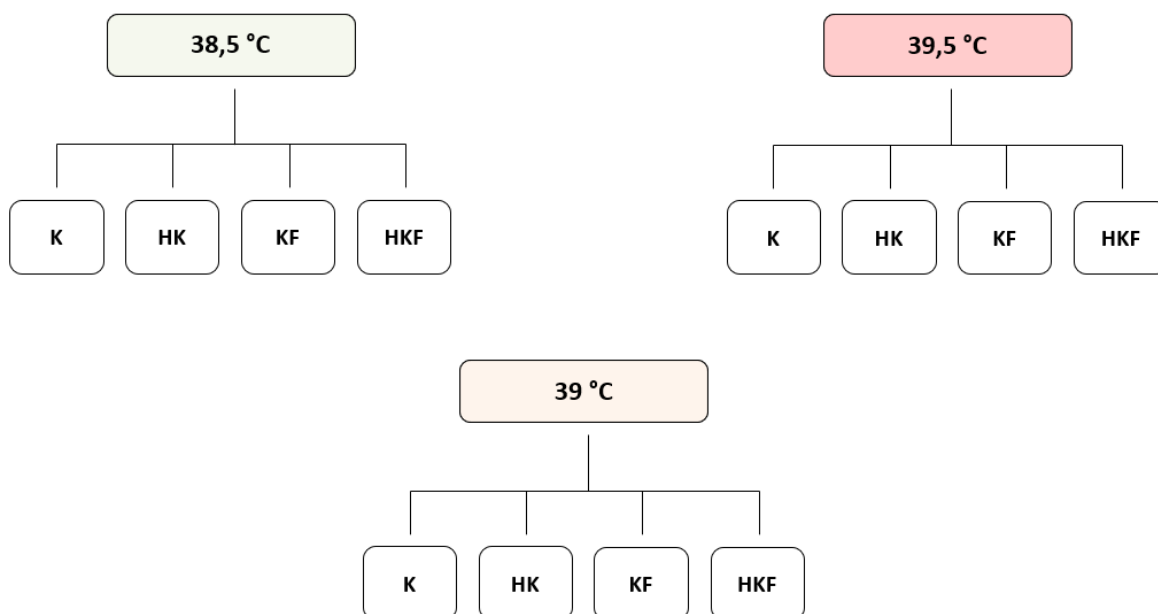
A hosszú távú embriótenyésztés előkészítéséhez az embriók előállítására a „C” kísérletben ismertetett protokollt alkalmaztam. Az embriókat az embriótenyésztés hetedik napján krioprezervációnak vetettük alá, majd a cseppfolyós nitrogénbe helyezést követően a korábban ismertetett protokoll szerint felolvasztottuk. A felolvasztást követően az embriókat BO-IVC tenyésztőmédiumba helyeztük. Az embriótenyésztés nyolcadik napján a friss blasztocisztákat, valamint a krioprezervációt túlélő embriókat előzetesen ekvilibrált, 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., 2018; López-Gatius–Hunter, 2020; Vitali et al., 2023) alapján becsült méhen belüli hőmérsékleti viszonyok figyelembevételével határoztuk 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 mintaelemszámai 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 4. ábra szemlélteti.



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

3.3. 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 vizsgálathoz 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.

3.4. 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 kell 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-lánreakcióhoz (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 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 mintatérfogat (2 µL) alkalmazásával. A cDNS-szintézis négy egymást követő lépésből állt: poli(A)-farok hozzáadása, adapter-ligáció, reverz transzkripció (RT), valamint miR-Amp preamplifikáció. A hígítatlan miR-Amp reakciótermékeket a valós idejű

qPCR-analízis elvégzéséig $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on tároltuk. A vizsgált miRNS-ek a miR-191-5p, miR-320a-3p, miR-372-3p, miR-378a-3p és miR-138-5p voltak.

Minden assay esetében negatív kontrollreakciót is futtattunk. A miR-92a-3p-t endogén referencia-miRNS-ként (belső kontrollként) alkalmaztuk a génexpressziós adatok normalizálásához.

3.5. 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 embriókat $50\text{ }\mu\text{L}$ festőoldatot tartalmazó cseppekben, szobahőmérsékleten, sötétben 15 percig inkubáltuk. 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.

3.6. Immunfestés

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, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on, sötét környezetben. A sejtmagok ellenfestését TO-PRO-3 jodiddal (1:500; Thermo Fisher Scientific) végeztük 15 percig szobahőmérsékleten. 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.

3.7. Statisztikai értékelés

Az adatokat binomiális hibaszerkezetű, logit kapcsolófüggvényű általánosított lineáris vegyes modellekkel (GLMM) elemeztük. Az alkalmazott eljárásokat a 4. táblázat foglalja össze. A szignifikanciahatár $p < 0,05$ volt.

4. táblázat. Az alkalmazott statisztikai és kvalitatív értékelési eljárások

Vizsgált változó	Módszer és modellfelépítés	Összehasonlítás és közlés
Blasztociszta-arány „A” és „C”	GLMM; fix hatás: kezelés; véletlen hatások: biológiai ismétlés és tenyésztőcsepp.	Páronkénti összehasonlítás Tukey-korrektcióval.
Felolvasztás utáni túlélés „B” és „C”	GLMM; fix hatás: kezelés; véletlen hatás: biológiai ismétlés.	Páronkénti összehasonlítás Tukey-korrektcióval.
Prolongált túlélés „D”, D10–D14 együtt	GLMM; fix hatások: tenyésztési hőmérséklet, hőkezelés, krioprezerváció és tenyésztési nap; véletlen hatás: biológiai ismétlés.	A főhatások együttes értékelése; D8 nem szerepelt a modellben.
Prolongált túlélés „D”, naponként	Külön GLMM D10, D12 és D14 esetén. Fix hatások: hőmérséklet, hőkezelés, krioprezerváció és valamennyi két- és háromutas interakciójuk; véletlen hatás: biológiai ismétlés.	III. típusú Wald-féle χ^2 -próba; becsült marginális átlagok; K–HK összevetés hőmérséklet–krioprezerváció kombinációnként, Holm-korrektcióval. Becsült túlélési valószínűség, esélyhányados és 95%-os konfidenciaintervallum.
Génexpresszió „A” és „B”	Student-féle t-próba a kontrollhoz viszonyított fold change ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) értékeken.	A kontrollcsoporthoz viszonyított relatív expresszió.
Génexpresszió „C”	Egyszempontos varianciaanalízis, majd Student-féle t-próba a referenciagénre normalizált ΔC_t -értékeken.	Ábrázolás: $2^{-\Delta C_t}$; átlag $\pm$ SEM.
Sejtszintű vizsgálatok	Az apoptózis-, nekrosis- és immunfluoreszcens festések kvalitatív értékelése.	Kvalitatív összehasonlítás.

A GLMM-eket az R lme4 csomag glmer() függvényével illesztettük. Az „A–B” kísérletek arányadatait R 4.6.0 környezetben, maximum-likelihood becsléssel és Laplace-közelítéssel elemeztük; a Tukey-összehasonlításokhoz multcomp csomag: glht() függvényt alkalmaztunk. A „C–D” kísérletben R 4.5.0 környezetet, car csomag: Anova(), emmeans és ggplot2 eljárásokat használtunk. A „D” kísérlet túlélési arányait a D8 napon életben lévő embriók számához viszonyítottuk. D8-at a 100%-os túlélés miatti teljes szeparáció elkerülésére kizártuk a

modellekből; az elpusztult embriókat a későbbi időpontokban is elpusztultként vettük figyelembe. A qPCR-adatokat Eppendorf RealPlex és GenEx 7.0 szoftverrel dolgoztuk fel. A referenciák kiválasztásához NormFinder-elemzést alkalmaztunk; a belső kontroll *EEF1A1*, illetve miR-92a-3p volt. A génexpressziós analízis biológiai egysége az ismétlésenként és csoportonként poolozott minta (n = 3 biológiai ismétlés); a három technikai párhuzamos nem önálló biológiai ismétlés.

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 közöltük: Nagy *et al.*, 2026.

4. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK

Vizsgálatunk során 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 tehenek eltérő környezeti hatásaiból és az egyedi biológiai különbségekből adódhattak.

4.1. Blasztociszta és túlélési arányok elemzése

4.1.1. „A” kísérlet

Az egyes ismételtesekben meghatározott blasztociszta-arányokat az 5. táblázat szemlélteti.

5. 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

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.

4.1.2. „B” kísérlet

A felolvasztás utáni túlélési arányok mind a kontroll-, mind a hőkezelt csoportban az egyes kísérleti ismételések között eltérést mutattak. A felolvasztás utáni túlélési arányokat a 6. táblázat foglalja össze.

6. táblázat. Túlélési arányok alakulása az egyes ismételések során

Ismételés	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 kontrollcsoportban a felolvasztás utáni túlélési arány 73% és 100% között, míg a hőkezelt csoportban 60% és 95% között változott az egyes biológiai ismételések 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 ($SD = 0,16$).

4.1.3. „C” kísérlet

Az egyes ismételésekben meghatározott blasztociszta-arányokat a 7. táblázat szemlélteti.

7. táblázat. Blasztociszta-arányok alakulása az egyes ismételések során

Ismételés	Kísérleti nap	Kísérleti csoport	Blasztociszták 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 „C” kísérlet során megállapított túlélési arányokat a 8. táblázat mutatja be.

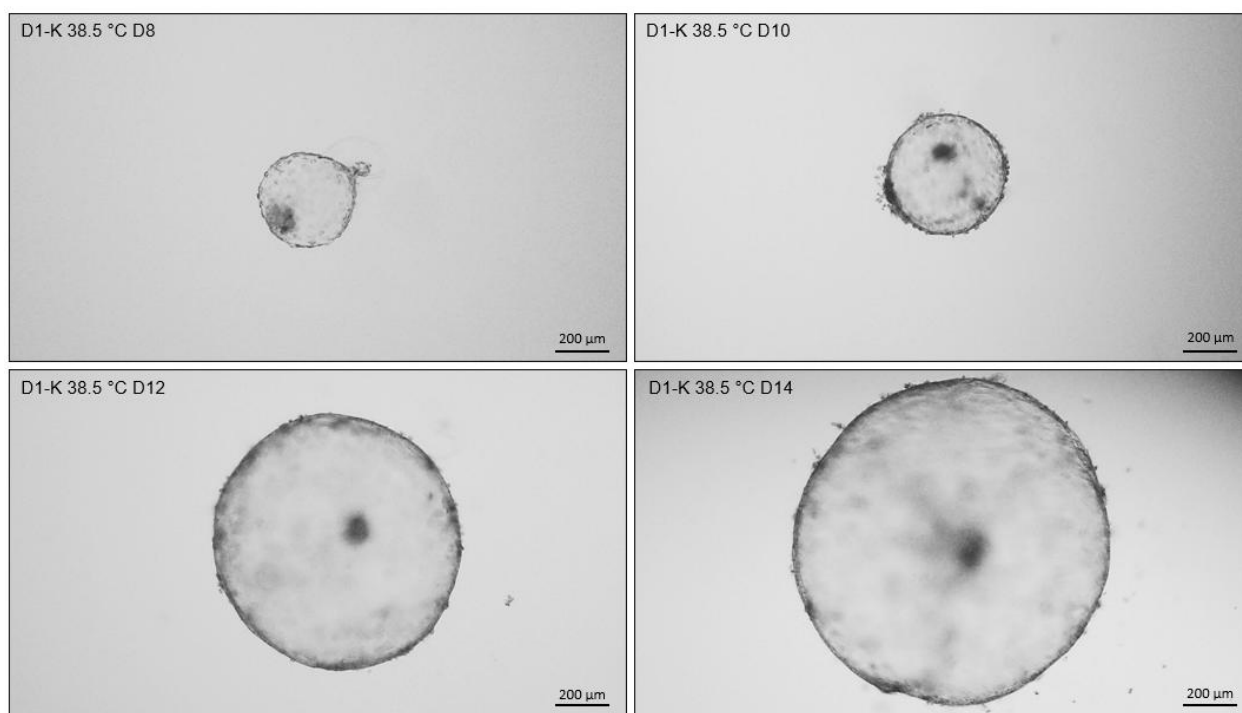
8. táblázat. Túlélési arányok alakulása az egyes ismétlések során

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

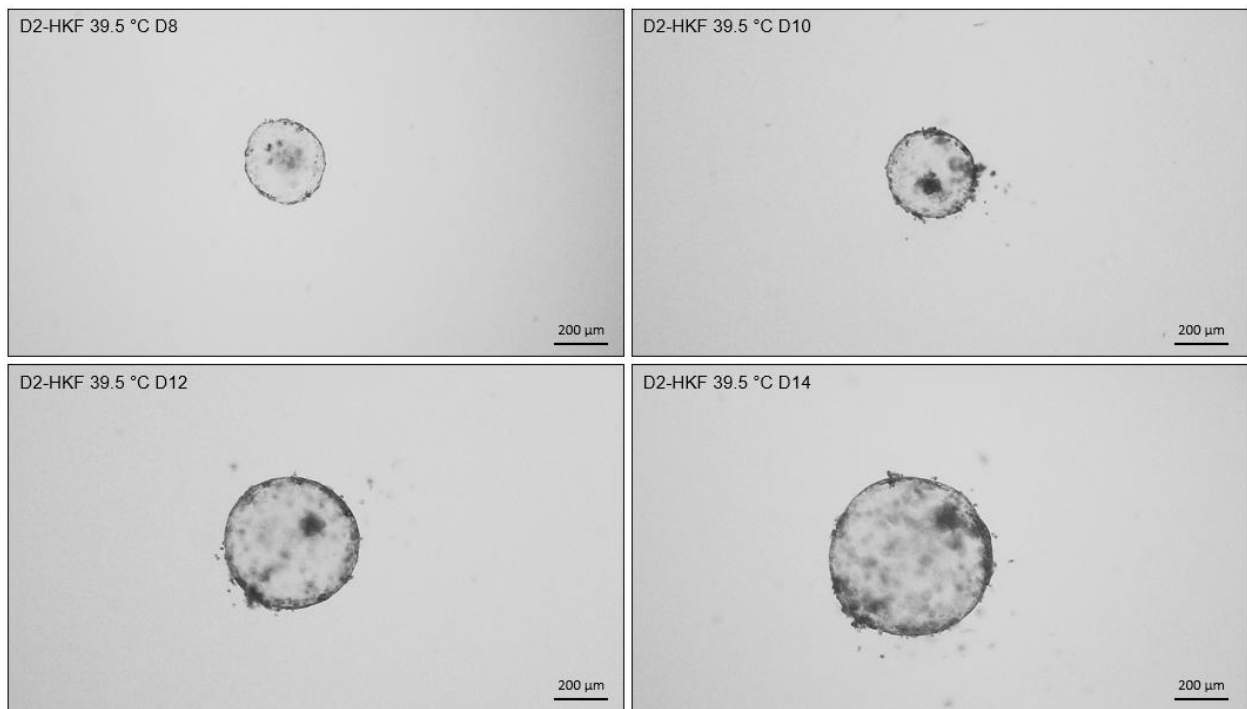
Az általánosított lineáris vegyes modell elemzése alapján a hőkezelés nem gyakorolt szignifikáns hatást az embriók fejlődésére. A blasztociszta-arány a kontroll- és a hőkezelt csoport között sem a tenyésztés 7. napján (68,3%, 164/240 és 69,2%, 166/240; $p = 0,844$), sem annak 8. napján (79,2%, 190/240 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 ($p = 0,340$).

4.1.4. „D” kísérlet

A hosszú távú embriótenyésztés során megfigyelhető morfológiai változásokat az 5. és 6. ábra szemlélteti.

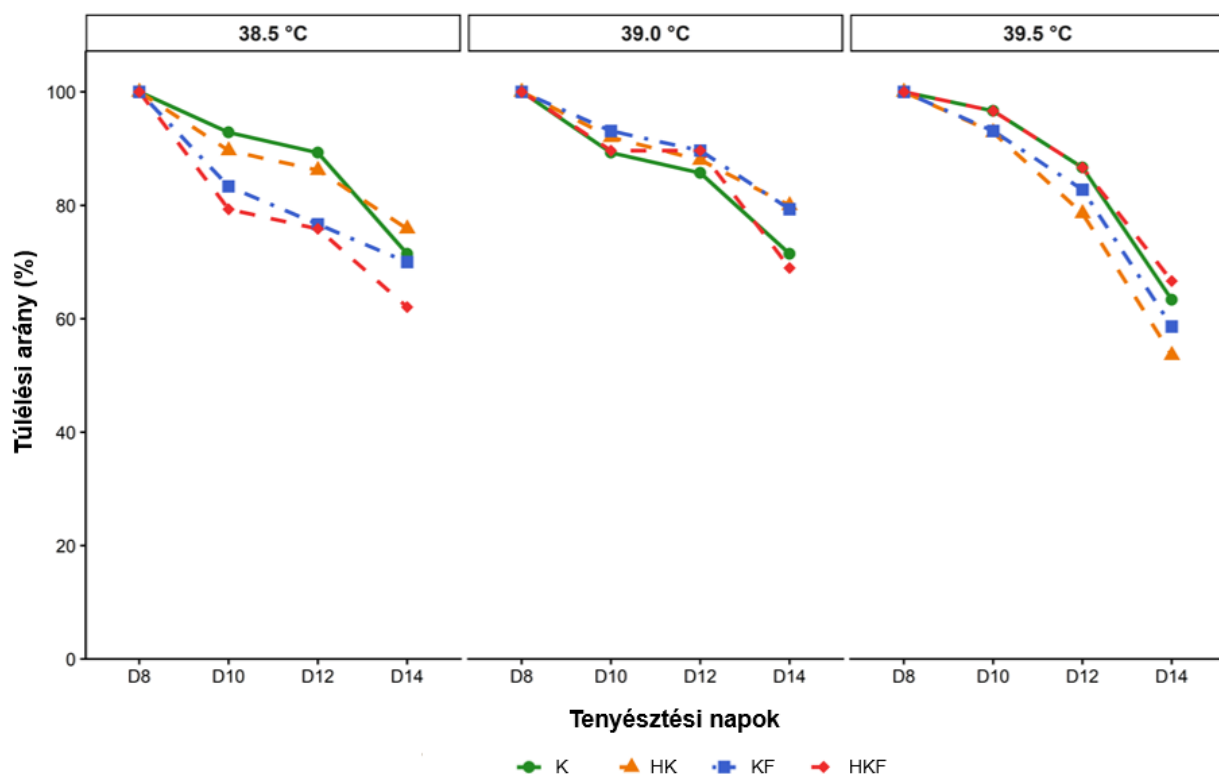


5. ábra. *In vitro* előállított szarvasmarha blasztociszta morfológiai változásai prolongált tenyésztés során a 38,5 °C-on tenyésztett kontrollcsoportban (K) (D8–D14)



6. 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 (7. ábra).



7. 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.

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.

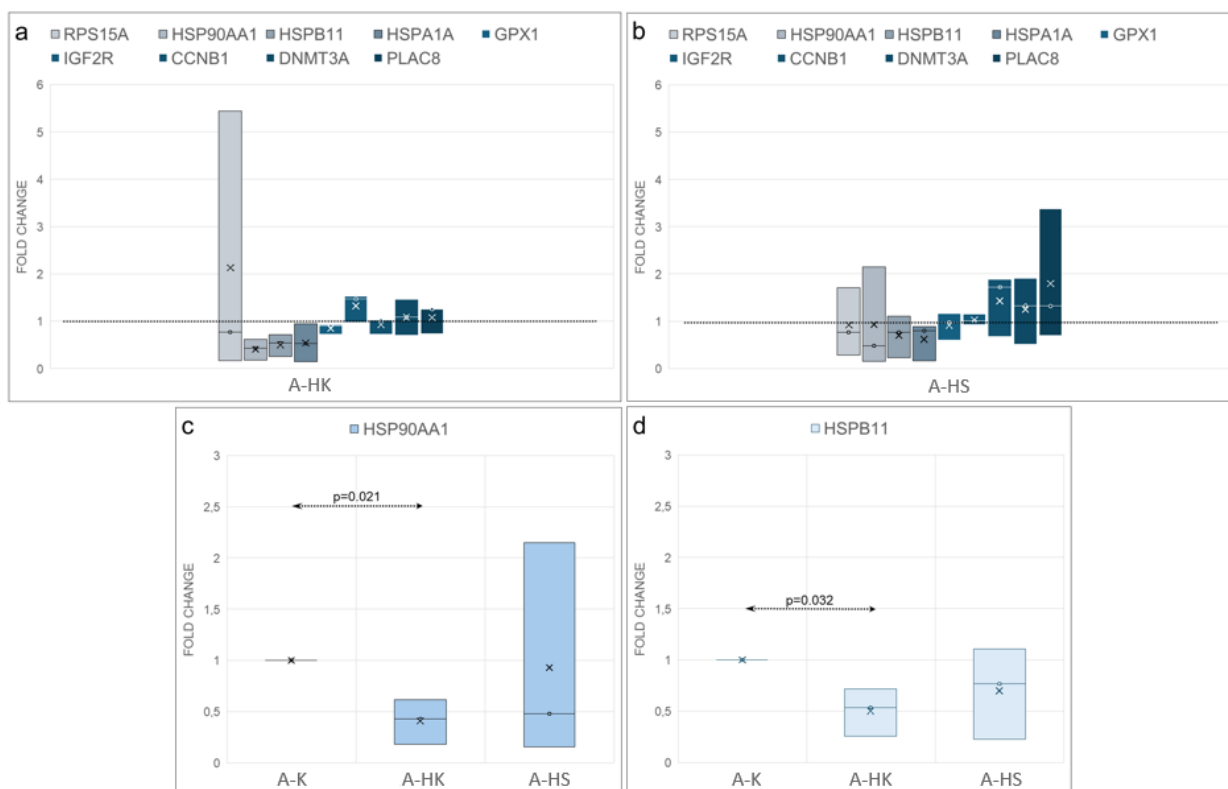
Tekintettel arra, hogy a vizsgálat elsődleges célja annak meghatározása volt, hogy a hőkezelés javítja-e az embriók túlélését emelt tenyésztési hőmérsékleten, illetve krioprezervációt követően, a D10, D12 és D14 tenyésztési napokat külön-külön is elemeztük faktoriális GLMM alkalmazásával. A tenyésztési 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: $p = 0,370-0,702$).

4.2. Génexpressziós mintázatok analízise

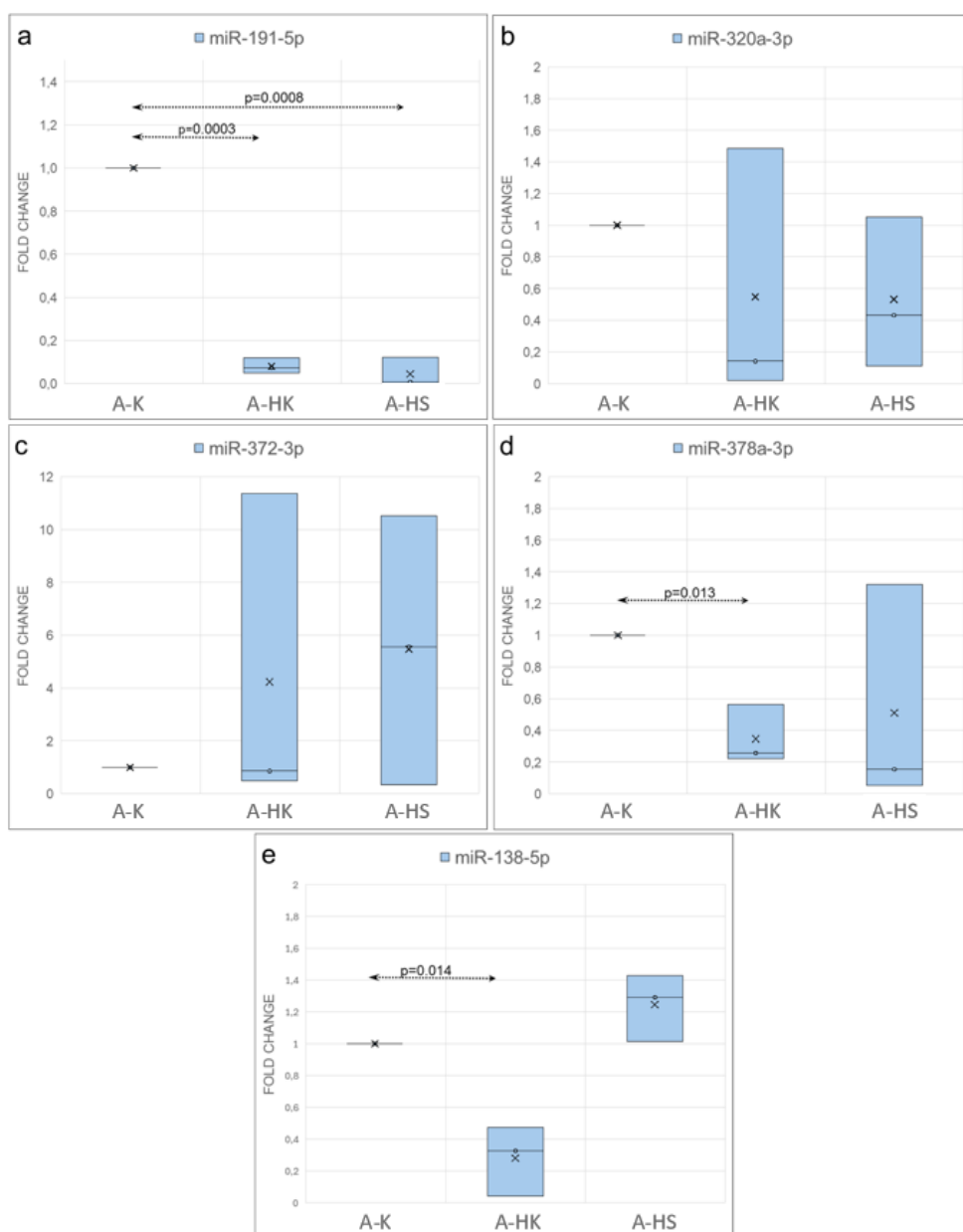
4.2.1. „A” kísérlet

A vizsgált gének relatív expressziós szintjeit a két kezelt csoportban (HK: hőkezelt; HS: hősokk), a kontrollcsoporthoz viszonyítva a 8a. és 8b. ábra mutatja be. A 8c. és 8d. 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.



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

A 9. 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 kontrollcsoportához viszonyítva. A vizsgált miRNS-ek közül a miR-191-5p expressziós szintje mind a hőkezelt ($p < 0,001$), mind a hő sokknak kitett csoportban ($p < 0,001$) szignifikánsan csökkent a kontrollcsoportához viszonyítva (9a. ábra). Ezzel szemben a miR-378a-3p ($p = 0,013$) (9d. ábra) és a miR-138-5p ($p = 0,014$) (9e. ábra) esetében szignifikáns expressziócsökkenés kizárólag a hőkezelésnek kitett csoportban volt megfigyelhető.

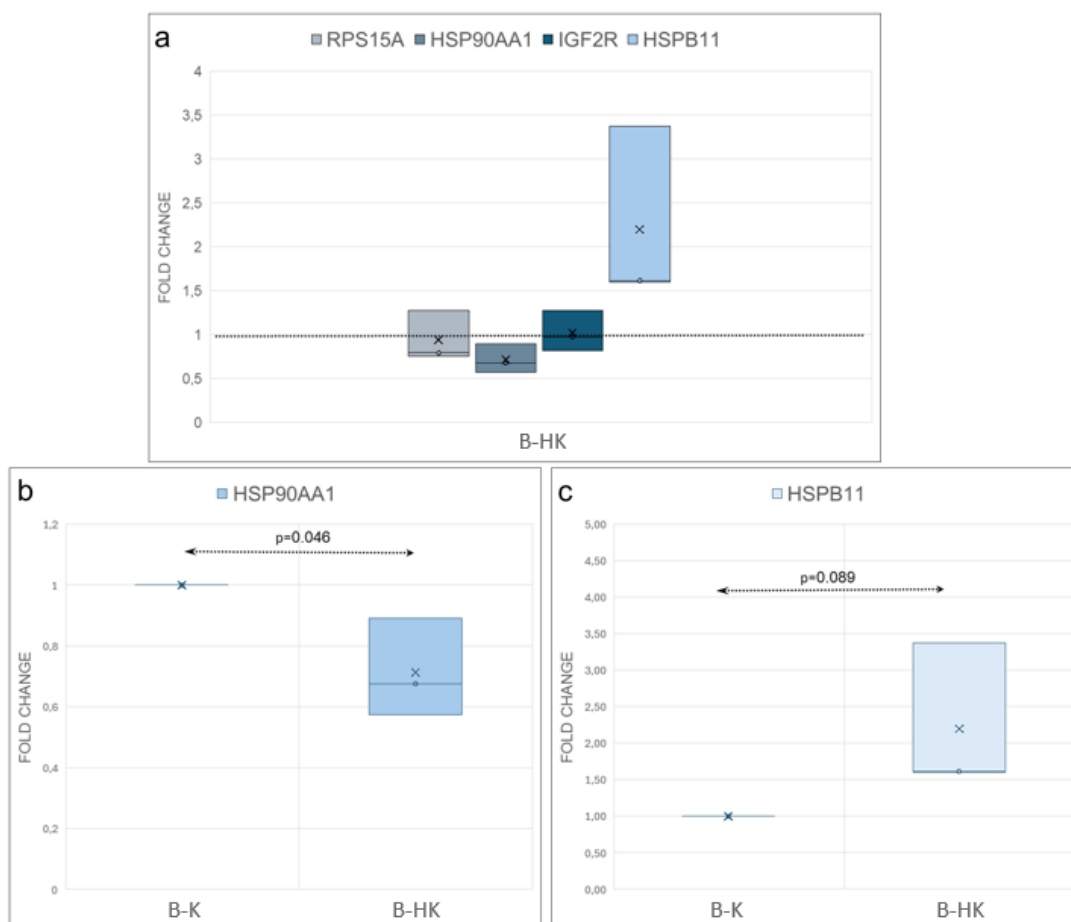


9. ábra. A vizsgált miRNS-ek relatív expressziós szintjei. (a) A miR-191-5p relatív expressziós szintje; (b) a miR-320a-3p relatív expressziós szintje; (c) a miR-372-3p relatív expressziós szintje; (d) a miR-378a-3p relatív expressziós szintje; (e) a miR-138-5p relatív expressziós szintje.

4.2.2. „B” kísérlet

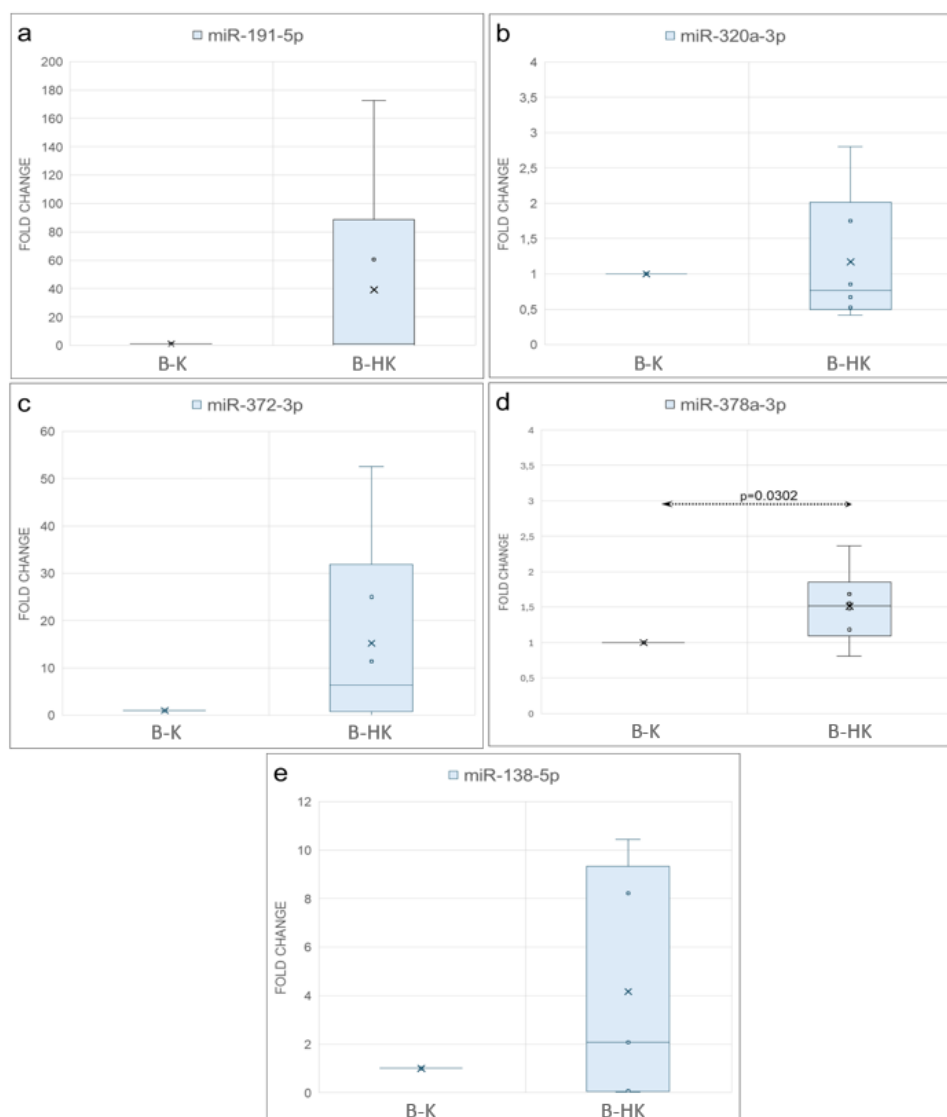
A vizsgált gének relatív expressziós szintjeit a 10. ábra mutatja be. A 10a. ábra alapján a *HSP90AA1* gén expressziós szintje hőkezelés hatására szignifikánsan csökkent ($p = 0,046$), míg a többi vizsgált marker expressziója a kontrollcsoportéhoz hasonló maradt. A *HSP90AA1* expressziójának csökkenése ezen kísérleti körülmények között is szignifikáns volt (10b. 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 ($p = 0,089$) (10c. ábra).



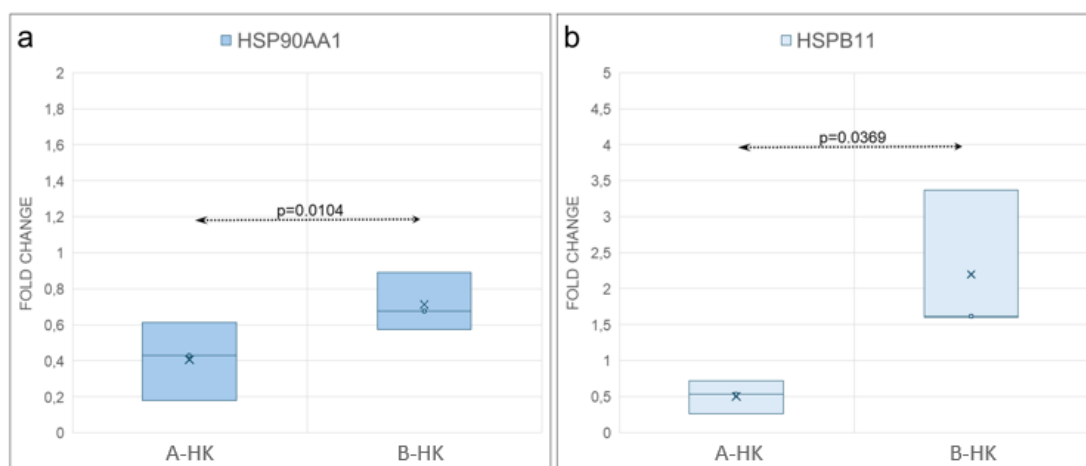
10. ábra. (a) A vizsgált gének relatív expressziós szintjei; (b) a *HSP90AA1* gén relatív expressziós szintje; (c) a *HSPB11* gén relatív expressziós szintje az embriók felolvasztását követően

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. A vizsgált miRNS-ek közül kizárólag a miR-378a-3p expressziója volt szignifikánsan magasabb a hőkezelt csoportban a kontrollcsoporthoz viszonyítva (11d. ábra; $p = 0,03$). Az „A” kísérletben szignifikáns változást mutató további miRNS-ek expressziója a „B” kísérletben nem különbözött szignifikánsan a két csoport között (11a., b., c., e. ábra).



11. 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” 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 (12. ábra). Mivel azonban az adatok két különálló kísérletből származtak, közvetlen összehasonlíthatóságuk korlátozott, ezért a megfigyelt eltérés nem tulajdonítható egyértelműen kizárólag a krioprezerváció hatásának.



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

4.2.3. „C” kísérlet

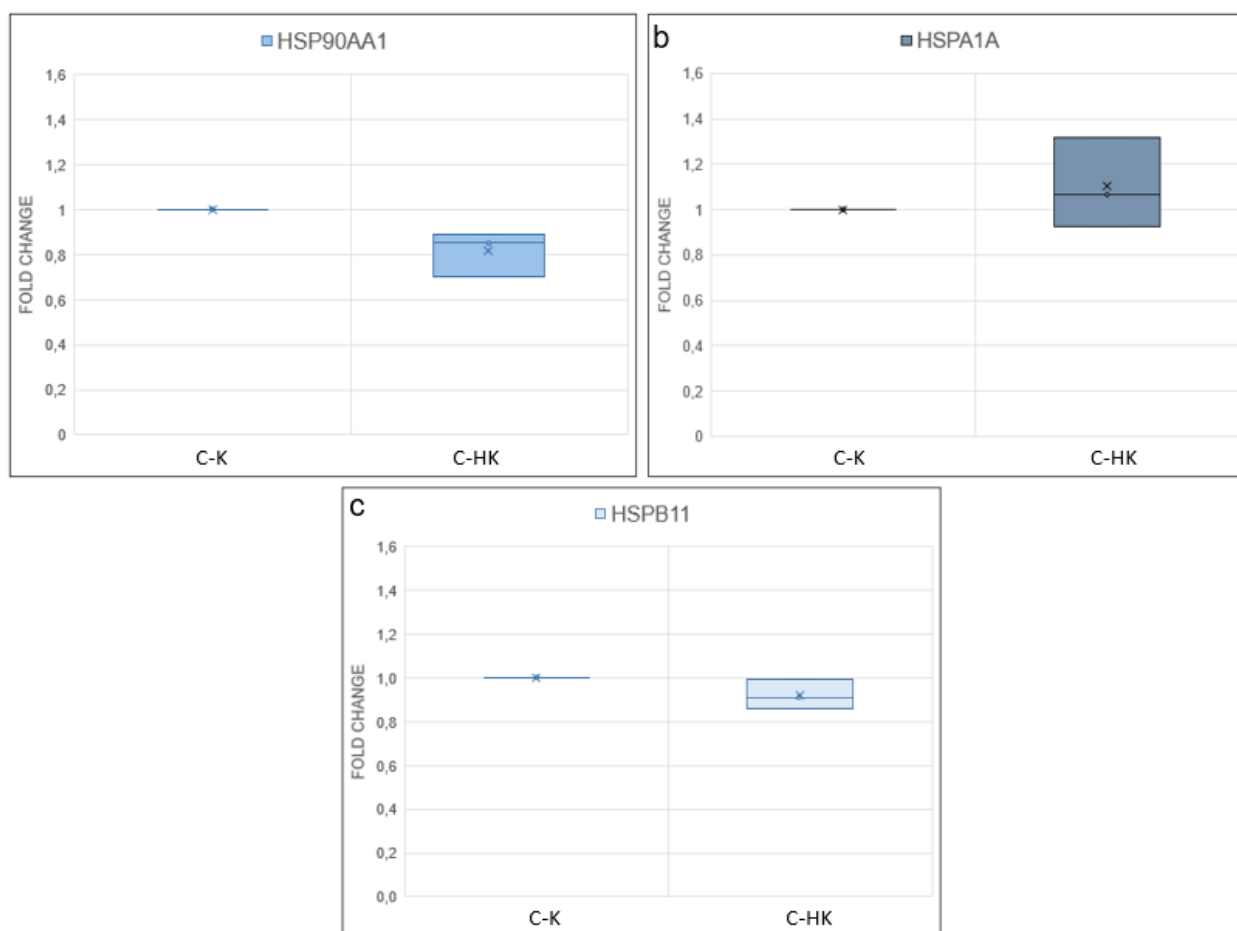
A „C” kísérletben (C_K, C_HK, C_KF, C_HKF) a hőkezelés hatását három hősokkfehérjét kódoló gén – a *HSP90AA1*, a *HSPA1A* és a *HSPB11* – expressziójának vizsgálatával értékeltük a tenyésztés 7. és 8. napján gyűjtött friss blasztocisztákban, valamint a krioprezervációt és felolvasztást követően. A „C” kísérlet során a 7. napon vett minták génexpressziós analízisének eredményeit a 9. táblázatban foglaltam össze.

9. 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.

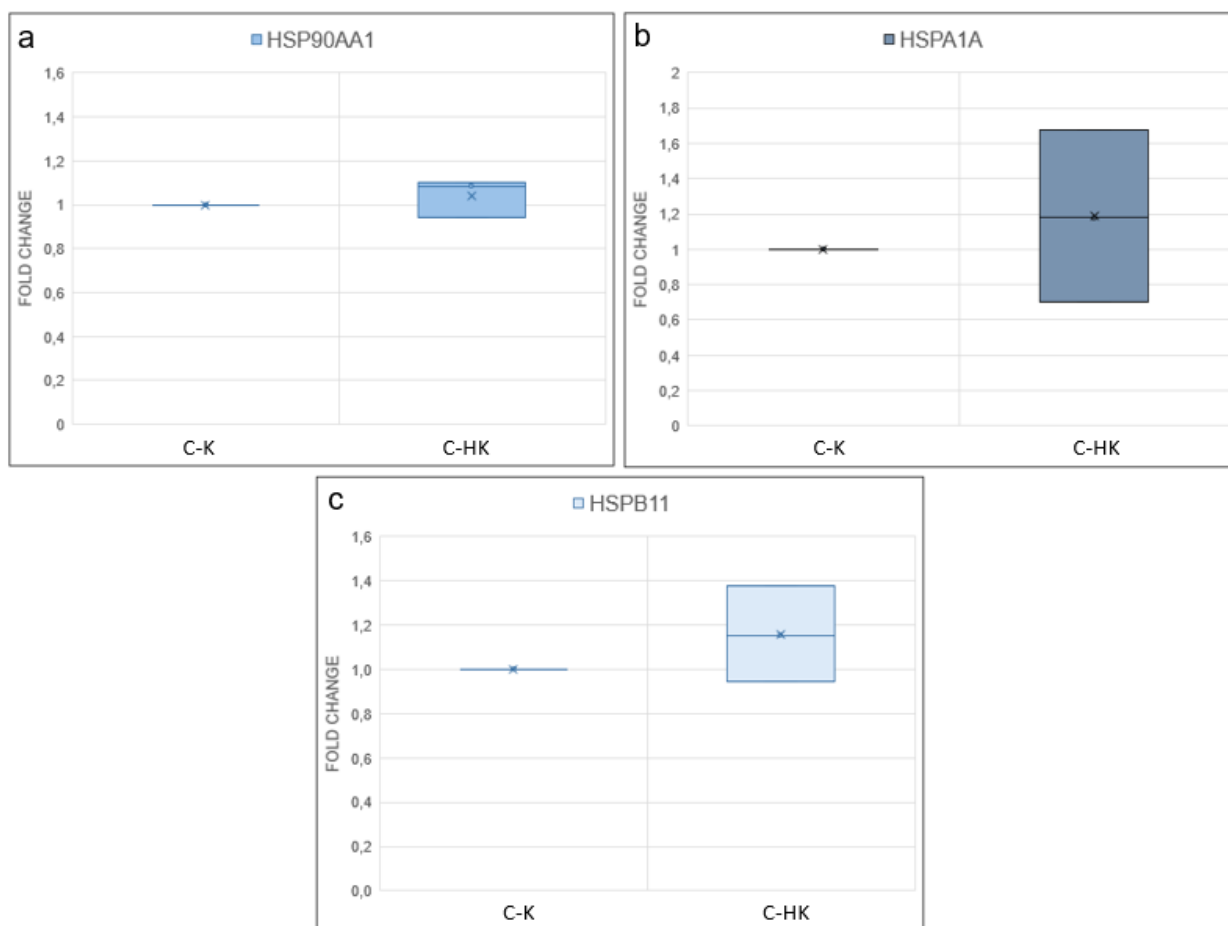
n.s. – nem szignifikáns

A tenyésztés 7. napján a *HSP90AA1* gén (13a. 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* (13c. 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 (13b. ábra) gyakorlatilag változatlan maradt ($0,0091 \pm 0,0017$ vs. $0,0098 \pm 0,0017$; $p = 0,246$).



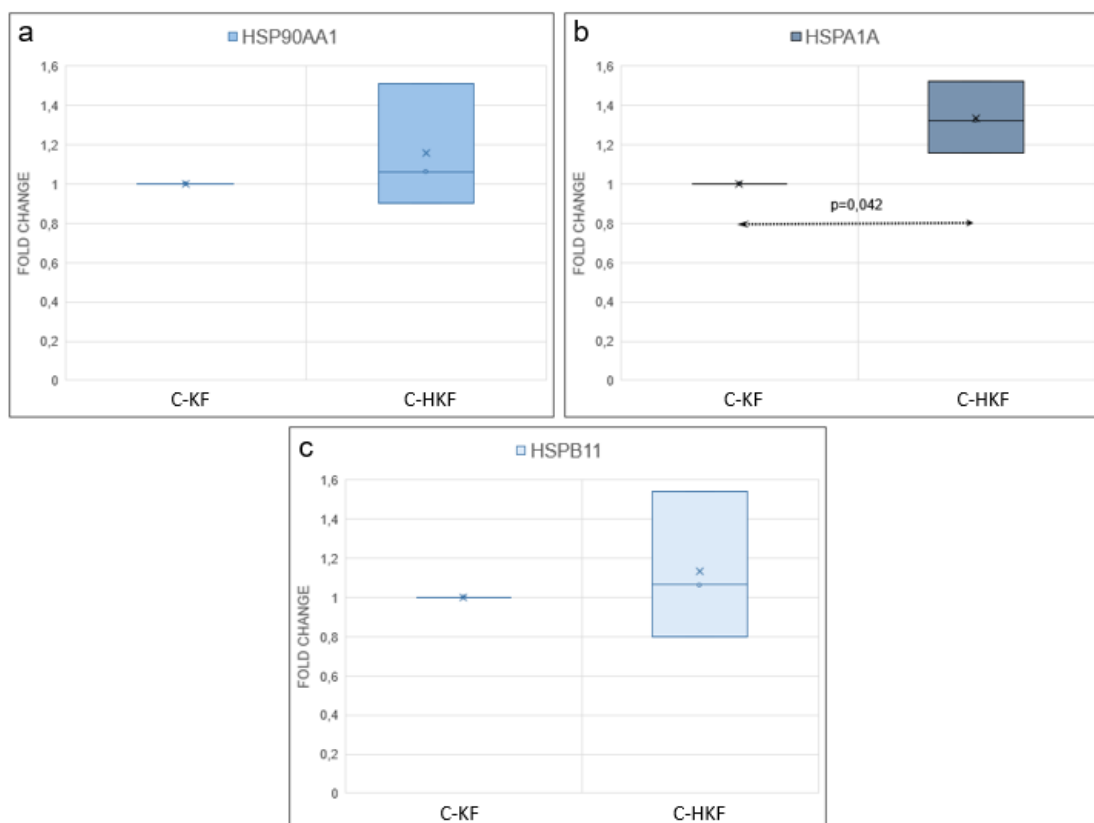
13. ábra. A *HSP90AA1* (a), *HSPA1A* (b) és a *HSPB11* (c) gének expressziós szintje az embriótenyésztés 7. napján gyűjtött mintákban a „C” kísérlet során

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* (14a. ábra): $0,0458 \pm 0,0022$ vs. $0,0479 \pm 0,0039$; *HSPA1A* (14b. ábra): $0,0121 \pm 0,0019$ vs. $0,0129 \pm 0,0011$; *HSPB11* (14c. 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 transzkripciós hatása átmeneti, és a blasztociszta-fejlődés előrehaladtával lecseng.



14. 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 (15b. 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* (15a. ábra) ($0,0495 \pm 0,0010$ vs. $0,0570 \pm 0,0058$; $p = 0,253$) és a *HSPB11* (15c. ábra) ($0,000294 \pm 0,000033$ vs. $0,000328 \pm 0,000047$; $p = 0,341$) esetében hasonló irányú, de nem szignifikáns emelkedés volt megfigyelhető.



15. 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: $p = 0,168$).

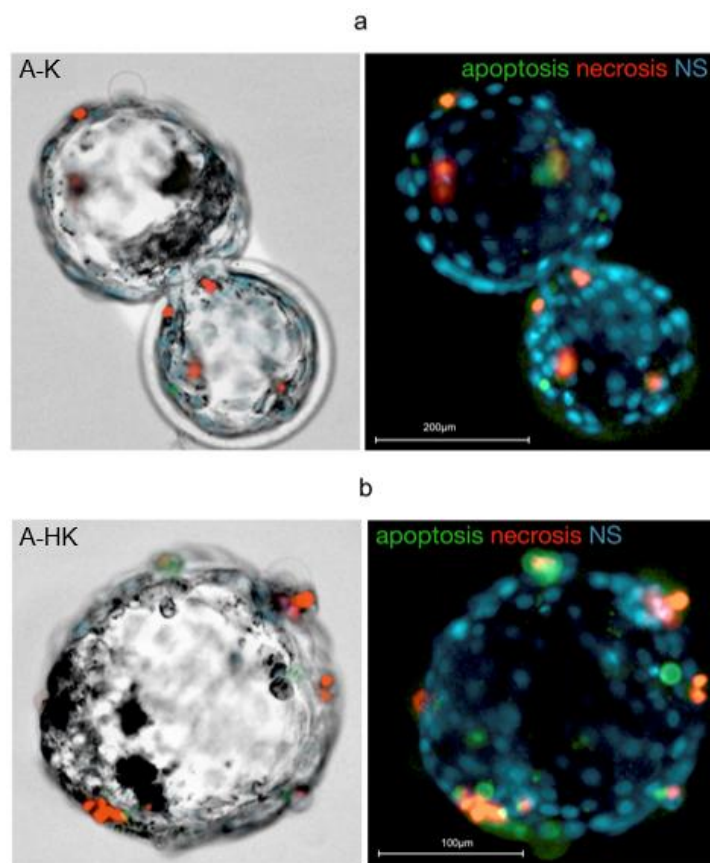
A két hatás együttes érvényesülését a friss kontroll- és a krioprezervált hőkezelt csoport összevetése szemlélteti: ebben az összehasonlításban a *HSPA1A* expressziója 5,74-szeresére emelkedett ($0,0091 \pm 0,0017$ vs. $0,0488 \pm 0,0029$; $p = 0,009$), a *HSPB11* esetében pedig 2,45-szörös, a szignifikancia 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,

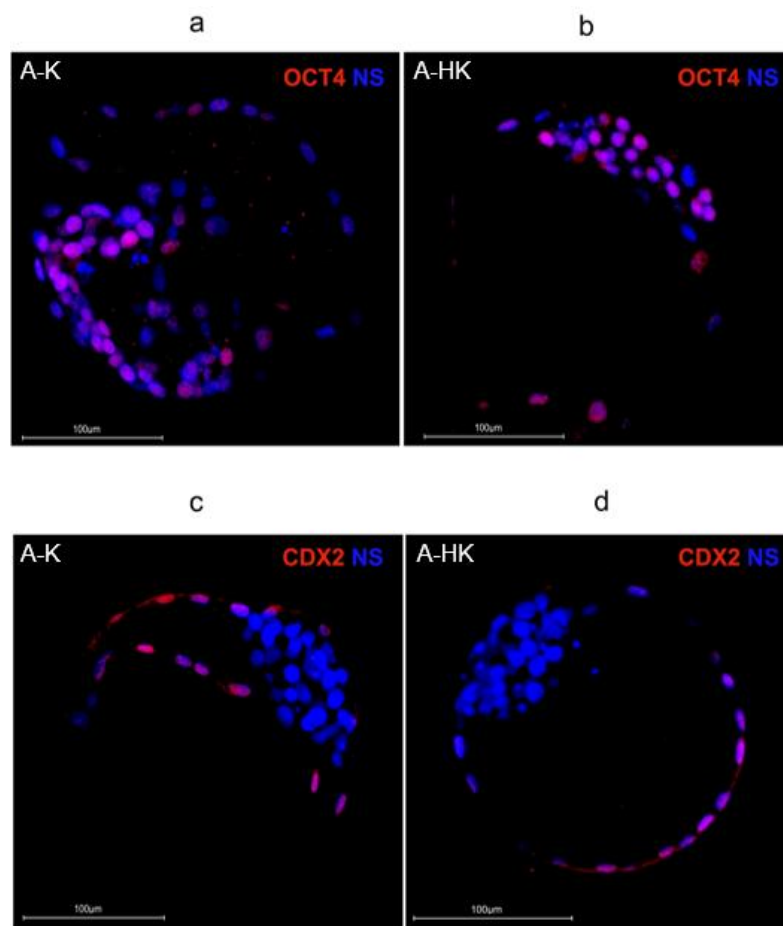
hogyan az előzetes hőkezelés módosítja az embriók krioprezervációra adott molekuláris válaszát, ugyanakkor – mivel a fejlődési és túlélési mutatókban nem volt kimutatható különbség (4.1.3. fejezet) – ezek a változások önmagukban nem igazolják a kriotolerancia javulását.

4.3. Apoptózis-, nekrosis- és immunfluoreszcens festés

A kezelés hatásának szemléltetésére apoptózis- és nekrosisfestési (16. ábra), valamint immunfluoreszcens festési eljárást (17. ábra) alkalmaztunk az embriók morfológiájának és a vizsgált markerek lokalizációjának kvalitatív értékelése céljából. Az apoptózis- és nekrosisfestés 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 sejtötegben mutattuk ki, tehát a vizsgált markerek lokalizációjában kvalitatív eltérés nem volt megfigyelhető a kontroll- és a hőkezelt csoport között.



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



17. 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.

5. KÖVETKEZTETÉSEK ÉS JAVASLATOK

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. 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. 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 sejttúlélési 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. 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 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. 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.

Az alkalmazott hőkezelés egyik kísérletben sem befolyásolta a fejlődéshez kapcsolódó markerek expresszióját. 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-célgének előrejelzéséhez a TargetScan adatbázis legfrissebb verzióját (v8.0; targetscan.org) használtuk (18. ábra).

Human AHSA1 ENST00000216479.3 3' UTR length: 225

1.....10.....20.....30.....40.....50.....60.....70.....80.....90...	
Human	GGCCAGCGGC-AGG-GGAC---UCCA---G---CCUGCU-GGACA---CUUCAGUCCAGCU-C-UCUCCU---GAC-UGGGGC-UUGCGACUC---ACAGGAUUGCAUCGU-CCCAG-CUG
Chimp	GGCCAGCGGC-AGG-GGAC---UCCA---G---CCUGCU-GGACA---CUUCAGUCCAGCU-C-UCUCCU---GAC-UGGGGC-UUGCGACUC---ACAGGAUUGCAUCGU-CCCAG-CUG
Rhesus	GGCCAGCGGC-AGG-GGAC---UCCA---G---CCUGCU-GGACA---CUUCAGUCCAGCU-C-UCUCCU---GAC-UGGGGC-UUGCGACUC---ACAGGAUUGCAUCGU-CCCAG-CUG
Squirrel	GGCCAGUAGC-AGG-GGGC---UCCA---G---CCUCC-UGACA---CUUCAGUCCAGCC-UCUCCU---GGC-UGGGGC-UUUGACUC---ACAGGAUUGCAUCGU-CCCAG-CUG
Mouse	GGCCAGCAAC-AG-GGGU---UCUG---G---CCUGU-UGAAA---CUUAGUCCAGCC---CUCU---GCA-AU-GGC-UUGUGACUC---ACAGGAUUGCAUCGU-CCCAG-CUG
Rat	GGCCAGCAGC-AG-GGGU---UCUG---G---CCUGU-UGAAA---CUUAGUCCAGCC---CUCU---GCC-AUGGGC-UUGUGACUC---ACAGGAUUGCAUCGU-CCCAG-CUG
Rabbit	GGCCAGCAGC-AG-GGGU---UCUG---G---CCUGU-UGAAA---CUUAGUCCAGCC---CUCU---GCC-AUGGGC-UUGUGACUC---ACAGGAUUGCAUCGU-CCCAG-CUG
Pig	GGCCAGCAGC-AG-GGGC---UGCA---G---CC-GCC-CAUCA---CUUUGGUCU-UCU-C-UCUCCU---GAC-U-GGGC-CUGUGACUC---ACAGGAUUGCAUCGU-CCCAG-CUG
Cow	GGCCAGCAGC-AG-GGGC---UGCA---G---CC-GCC-CAUCA---CUUUGGUCU-UCU-C-UCUCCU---GAC-U-GGGC-CUGUGACUC---ACAGGAUUGCAUCGU-CCCAG-CUG
Cat	GGCCAGCAGC-AG-GGGC---UGCA---G---CC-GCC-CAUCA---CUUUGGUCU-UCU-C-UCUCCU---GAC-U-GGGC-CUGUGACUC---ACAGGAUUGCAUCGU-CCCAG-CUG
Dog	GGCCAGCAGC-AG-GGGC---UGCA---G---CC-GCC-CAUCA---CUUUGGUCU-UCU-C-UCUCCU---GAC-U-GGGC-CUGUGACUC---ACAGGAUUGCAUCGU-CCCAG-CUG
Brown bat	AGCCAGCAGC-AG-GAGC---UCCA---G---CCUGCC-CGACA---CUUCAGUCCAGCC-C-UCUCCU---GAC-UGAGGC-U-UGACUC---ACAGGAUUGCAUCGU-CCCAG-CUG
Elephant	AGCCAGCAGC-AG-GAGC---UCCA---G---CCUGCC-CGACA---CUUCAGUCCAGCC-C-UCUCCU---GAC-UGAGGC-U-UGACUC---ACAGGAUUGCAUCGU-CCCAG-CUG
Opossum	UGUUAACUUCUACA-GGGC---CAGC---G---CCCAAC-UGGCA---GCUCAGUCCAGCU-C-UCUACU---GUC-UGCAGC-U-UGACUC---ACAGGAUUGCAUCGU-CCCAG-CUG
Macaw	UACUGGUGUC-UGG-GGG---C---UUUGUC-UACU---UCUCA---CCUGUC-C-UUUUCU---AAUCUUGGCC-CUGCUGCG---AGUAAAGUGGG-AU-GACAG-GUG
Chicken	UAAUGGUUGU-UGG-GGA---C---GCUGCC-UGACU---UCUCA---CCUUC-C-UUUUCU---AAUCUUGGCC-CUGCUGCG---AGUAAAGUGGG-AU-GACAG-GUG
Lizard	CACUGGCGAA-UGU-GGA---G---U---CUUGAC-CGAUC---UACCG---
X. tropicalis	AUUUUGCUGG-GGG-G---
Con	GGCCAGCaGC.aGG.GGGC...U.Ca...G.....CCUGCC.cGACA....CUUCAGUCCAGCC.C.UCUCU...GAC.UGGGGC.UUGUGACUC.....ACAGGAUUGCAUCGU.CCCAA.CCG

	Predicted consequential pairing of target region (top) and miRNA (bottom)	Site type	Context++ score	Context++ score percentile	Weighted context++ score	Conserved branch length	P _{CT}	Predicted relative K _D
Position 38-44 of AHSA1 3' UTR	5' ... CCUGCGGACACUUCAGUCCAGC ... 	7mer-m8	-0.23	92	-0.23	1.768	N/A	-2.765
hsa-miR-378a-3p	3' CGGAAGACUGAGGU-UCAGGUCA							

18. 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 hőkondicionálást 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.

A krioprezervációt megelőző kontrollált hőkezelés által kiváltott molekuláris változások háttérben 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.

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.

A CDX2 a trofektoderma differenciálódásának meghatározó markere, míg az OCT4 elsősorban a belső sejt-tömeg pluripotens sejtjeiben expresszálódik (Aguila *et al.*, 2022). A

vizsgálatunk során megfigyelt immunfluoreszcens lokalizáció megfelelt ennek a sejtvonal-specifikus expressziós mintázatnak. Megfigyeléseink arra utalnak, hogy a hőkezelés nem befolyásolta a blasztocisza sejtvonalainak differenciálódását és térbeli szerveződését, illetve nem idézett elő olyan fejlődési rendellenességet, amely a trofektoderma és a belső sejtöteg 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.

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.

A felolvasztást követő 24 órában megfigyelt túlélési arány jelen kísérletben is meghaladta a szakirodalomban lassú fagyasztást követően általában közölt 24 órás reexpansziós 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.

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.

6. 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.

7. IRODALOMJEGYZÉK

- 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>
- 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>
- 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>
- Arshad U., Sagheer M., González-Silvestry F.B., Hassan M., Sosa F. (2021) Vitrification 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>
- 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>
- 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>
- 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>
- 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>
- 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>
- 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>
- Lees A.M., Lea J.M., Salvin H.E., Cafe L.M., Colditz I.G., Lee C. (2018) Relationship between Rectal Temperature and Vaginal Temperature in Grazing *Bos taurus* Heifers. *Animals* 8(9):156. <https://doi.org/10.3390/ani8090156>

- 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>
- 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>
- Miętkiewska 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>
- 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>
- 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>
- 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>
- 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>
- 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>
- Török Z., Pilbat A.-M., Gombos I., Hocsák E., Sümegi B., Horváth I., Vígth 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

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>

7. 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