

Állatorvostudományi Egyetem
Szülészeti Tanszék és Haszonállat-Gyógyászati Klinika

Az asszisztált reprodukciós technikák alkalmazása a
sertéstenyésztésben

The Application of Assisted Reproductive Technologies in Pig
Breeding

Borbély Mariann

Témavezető: Dr. Horváth András

Szülészeti Tanszék és Haszonállat-Gyógyászati Klinika

2024

Absztrakt

A szakdolgozat egy olyan átfogó vizsgálatot nyújt a sertésenyésztésben alkalmazott asszisztált reprodukciós technikák (ART) területéről, amely kiemelten foglalkozik a mesterséges termékenyítés, az embriótranszfer, valamint a génszerkesztési és in vitro embriótermelési módszerek szerepével és hatékonyságával. A szakdolgozat hangsúlyozza az ART jelentőségét a sertések szaporodásbiológiai mutatóinak javításában, a gazdasági hatékonyság növelésében és a fenntartható fehérjetermelés biztosításában. Az egyes technológiák bemutatása mellett részletezi azok előnyeit és esetleges korlátait a hagyományos tenyésztési módszerekkel szemben. A dolgozat rávilágít az ART jövőbeli kihívásaira, különösen a mesterséges termékenyítésben folytatott kutatások kapcsán, amelyek tovább optimalizálhatják a tenyésztés hatékonyságát.

Abstract

The thesis provides a comprehensive examination of the field of Assisted Reproductive Technologies (ART) in pig breeding, with a focus on the role and effectiveness of artificial insemination, embryo transfer, gene editing, and in vitro embryo production methods. The study emphasizes the importance of ART in improving reproductive metrics in pigs, enhancing economic efficiency, and ensuring sustainable protein production. Alongside presenting each technology, it details their advantages and potential limitations compared to traditional breeding methods. The thesis also highlights future challenges for ART, especially in relation to ongoing research in artificial insemination, which could further optimize breeding efficiency.

Tartalomjegyzék

Táblázatok és ábrák jegyzéke	5
Táblázatok jegyzéke	5
Ábrák jegyzéke	5
Rövidítések jegyzéke	6
1. Bevezetés és célkitűzés	8
2. Irodalmi áttekintés	9
2.1. Az asszisztált reprodukció történetének rövid áttekintése	9
2.2. A sertés ivari ciklusának rövid áttekintése	10
2.3. Asszisztált reprodukciós technikák (ART)	13
2.3.1. Mesterséges termékenyítés (AI)	14
2.3.1.1. Spermagyűjtés lehetőségei, kivitelezése	14
2.3.1.2. Spermabírálat és tárolás	16
2.3.1.3. Ivarzás beindítása és ivarzásszinkronizáció	21
2.3.1.4. Az ivarzás detektálás módszerei	24
2.3.1.5. Inszeminálási technikák ismertetése, azok előnyei, hátrányai	26
2.3.1.6. A sikeres termékenyítés ellenőrzése	28
2.3.2. Embriótranszfer (ET)	29
2.3.2.1. Milyen problémákba ütközhetünk a sertésembrió-transzfer esetében?	29
2.3.2.2. Embriótranszfer kivitelezése sertésekben	31
2.3.3. In vitro embriótermelés (IVP)	35
2.3.4. Genetikailag módosított sertések előállítása, génszerkesztés (GE)	38
2.3.5. Genetikailag módosított sertések a humán gyógyászatban	40
3. Összefoglalás	42
4. Köszönetnyilvánítás	43
5. Irodalomjegyzék	44
Melléklet	53

Táblázatok és ábrák jegyzéke

Táblázatok jegyzéke

1. táblázat: A különböző inszeminálási eljárásokhoz szükséges spermiumszám [7]	28
2. táblázat: Embrióbírálat szempontjai és az e szerinti felhasználhatóság [7]	33

Ábrák jegyzéke

1. ábra: Az ováriumban történő változások a nemi ciklus során [7]	13
2. ábra: Spermavételi eszközök: A) Kézi spermavétel B) Műhüvely C) Automata sperma levevő berendezés D) Elektroejakulátor [22] [23] [24] [25]	16
3. ábra: Mikroszkóp alatt látható morfológiai hibák [27]	17
4. ábra: A három kísérleti csoport beavatkozásai időrendi sorrendben [37]	23
5. ábra: A beadott hormonok hatása a folliculus átmérőjére a különböző csoportokban [37]	24
6. ábra: A különböző inszeminálási technikák: A) Cervicalis termékenyítés, B) Intrauterinalis termékenyítés, C) Mély intrauterinalis termékenyítés [44]	28
7. ábra: A katéter sziluettje a helyes méhszarvba történő behelyezése után (A, C). Az inszeminációs katéter helyzete a méhnyak bemeneténél (B, D) és az ET-katéter a méhnyak redőin keresztül (E) [56]	35

Rövidítések jegyzéke

AGS	Alpha Gal Syndrome
AI	Mesterséges Termékenyítés (Artificial Insemination)
ART	Asszisztált Reprodukciós Technológiák
ASFV	Afrikai Sertéspestis Vírus
Cas9	CRISPR-Associated Protein 9
CASA	Computer-Assisted Sperm Analysis
CRISPR	Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats
CSFV	Klasszikus Sertéspestis Vírus
DDAH2	Dimetilarginin-Dimetilaminohidroláz 2
DIUAI	Mély Intrauterin Mesterséges Termékenyítés
DM	Double Muscle
eCG	Equine Chorionic Gonadotropin
E2	17 β -oestradiol
ET	Embriótranszfer
EU	Európai Unió
FC	Áramlási Citometria
FDA	Food and Drug Administration (Egyesült Államok Élelmiszer- és Gyógyszerügyi Hivatala)
FSH	Follikulus Stimuláló Hormon
G-CSF	Granulocyte Colony-Stimulating Factor
GE	Génszerkesztés (Gene Editing)
GM	Genetikailag Módosított
GM-CSF	Granulocyte Macrophage-Colony Stimulating Factor
GnRG	Gonadotropin-Releasing Hormone
hCG	humán Choriogonadotropin
IGF1	Insulin like Growth Factor 1
IGF2R	Insulin like Growth Factor 2 Receptor
IL-6	Interleukin-6
IUAI	Intrauterin Mesterséges Termékenyítés (Méhben Belüli Ondóbevétel)
IVC	In Vitro Cultivation (In Vitro Kultiváció)
IVF	In Vitro Fertilizáció
IVM	In Vitro Maturation (In Vitro Érés)

IVP	In Vitro Embriótermelés
KI	Knock-In
KO	Knock-Out
LIF	Leukémia Inhibitor Faktor (Leukemia Inhibitory Factor)
LH	Luteinizáló Hormon
mAb	Monoklonális Antitest (Monoclonal Antibody)
M-CSF	Macrophage-Colony Stimulating Factor
MMP	Mitokondriális Membránpotenciál
MSTN	Miosztatin
MT	Mesterséges Termékenyítés
NNAT	Neuronatin
NO	Nitrogén-Oxid
NOS	Nitrogén-Oxid Szintáz
NSDU-ET	Nem-sebészi Mély Uterinális Embriótranszfer
OPU	Ovum Pick-Up (Petesejt-kinyerés)
P4	Progeszteron
PEDV	Sertés Epidémiás Hasmenés Vírus (Porcine Epidemic Diarrhea Virus)
pEPF	Korai Terhességi Faktor Sertésekben (Porcine Early Pregnancy Factor)
PGF2 α	Prosztaglandin F2 α
pH	pondus Hidrogenii (hidrogénion-kitevő)
PMSG	Pregnant Pare Serum Gonadotropin
PRRSV	Sertés Reproductív és Légzőszervi Szindróma Vírus (Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus)
TALEN	Transcription Activator-Like Effector Nuclease
TGEV	Transzmisszibilis Gasztroenteritisz Vírus
UPC 1	Uncoupling Protein 1
VCAM	Vaszkuláris Sejtadhéziós Molekulák (Vascular Cell Adhesion Molecules)
ZFN	Cink-ujj Nukleáz (Zinc Finger Nuclease)

1. Bevezetés és célkitűzés

Egy 2019-es tanulmány szerint a gyors népességnövekedésnek köszönhetően 2050-re 9,7 milliárd, 2100-ra közel 11 milliárd ember fog élni a Földön [1]. Ez magával vonzza azt, hogy a mezőgazdasági termékek mellett megnő az igény az állati fehérjék fogyasztására is [2]. Mindezek miatt nagy jelentősége van annak, hogy az állattenyésztést a jelenlegi és a jövőbeli igényeknek megfelelően a szükségek kielégítésére optimalizáljuk. Ennek egyik eszköze a megfelelő tenyésztési program és asszisztált reprodukciós eljárás kiválasztása és annak alkalmazása [3].

Szakdolgozatomban annak járok utána, hogy milyen asszisztált reprodukciós technikákat lehet alkalmazni annak érdekében, hogy a lehető legjobb szaporodásbiológiai mutatókat tudjuk elérni úgy, hogy az ne menjen a minőség rovására, de mégis gazdaságos legyen. Illetve azt is belefoglalom a diplomamunkámba, hogy ezeknek az eljárásoknak milyen előnyük, esetleg hátrányuk van a hagyományos, mára már elavult sertésenyésztéshez képest. Szeretnék a szakdolgozatommal egy átfogó képet nyújtani a jelenleg használt asszisztált reprodukciós technikákról. Emellett kitérek arra, hogy a jövőben milyen kihívásokkal kell szembesülnünk az alkalmazott technológiák terén amennyiben sertésenyésztésről vagy az ezzel kapcsolatos kutatásokról van szó. Mindezek mellett szeretnék a szakdolgozatomban arra is kitérni, hogy az egyes asszisztált reprodukciós technikáknak a nagymennyiségű és jóminőségű fehérjetermelés mellett milyen más lehetőségei lehetnek, milyen más területeken lehet ezeket az eljárásokat alkalmazni. Szakdolgozatomban igyekeztem a legfrissebb technológiákat összegyűjteni, de a már kiforrott gyakorlatokat is megemlítem ott, ahol ez szükséges.

2. Irodalmi áttekintés

2.1. Az asszisztált reprodukció történetének rövid áttekintése

Az állatok szaporodásának manipulálása valószínűleg egyidejű a háziasítással. Azzal, hogy az emberek elkezdtek az állatokat fogságban tartani, a természetes viselkedésük mellett hatással voltak az állatok szaporodására is. Az asszisztált reprodukciós technikák lehetővé teszik, hogy a mezőgazdasági haszonállatok genetikailag folyamatosan fejlődjenek. Ennek előnyeit felfedezve kezdtek el egyre többen ezzel a témával foglalkozni, amelynek hozadékaként egyre több kutató publikálta tudományos eredményeit az asszisztált reprodukcióval kapcsolatban.

Valószínűsítik, hogy az első asszisztált reprodukciót az arabok alkalmazták már az ókorban. Hímektől levett ondót használtak a női ivarú egyedek termékenyítéséhez. Ehhez képest az első sikeres mesterséges termékenyítés csak 1784-ben lett publikálva Lazzaro Spallanzani által [4]. Az olasz származású pap békákon való kísérletezése során fedezte fel, hogy a pete és a spermiumok érintkezése elengedhetetlen a termékenyüléshez [5].

Ezt követően szinte száz évet kell ugranunk az időben, hogy eljussunk a következő mérföldkőhöz az asszisztált reprodukcióban. 1890-ben történt meg az első embrióátültetés, melyet Walter Heape végzett nyúlra. Az ezt követő száz évben számos más állatfajon sikeresen végeztek embriótranszfert, ideértve az első sikeres embriótranszfert sertésen 1951-ben, amely Kvasnickii nevéhez köthető [6].

Ezt követően az asszisztált reprodukciós technikák rohamos mértékben fejlődni kezdtek. Ezek közül néhány jelentősebb időpontot kiemelnek. Ilyen az első embriómentesítés, melyet Wilmut és Rowson publikált 1973-ban. Az első borjút hozták létre fagyasztott embrióból. 1983-ban megtörtént a szarvasmarha in vitro fertilizációja Brackett és munkatársai által. 1985-ben létrehozták az első genetikailag módosított sertést és juhot. 1987-ben megtörtént az első klónozás embrionális sejtekből Prather és munkatársai által, majd tíz évvel később 1997-ben testi sejtekből Wilmut és munkatársai által. 2000-ben megalkották a haszonállattartó telepeken gyakran alkalmazott szexált spermát. 2012-ben Doudna és Charpentier a CRISPR/Cas9 génszerkesztési eljárással nagyban hozzájárult a manapság a génmanipulációban leggyakrabban alkalmazott technológiákhoz. Részben ennek köszönhetően azóta számos genetikailag módosított állatot, szervet, szövetet hoztak létre, amelyek hozzájárulnak az állattenyésztés és az orvostudományok fejlődéséhez egyaránt [7].

2.2. A sertés ivari ciklusának rövid áttekintése

Ahhoz, hogy a szakdolgozat egyes részeit megértsük, fontos tudnunk, hogy a sertések mikor lesznek ivarérettek, hogy milyen folyamatok játszódnak le a sertés nemi működése során és hogy ezekre a folyamatokra milyen hormonok, hogyan hatnak.

A sertések 5-17 hónaposan (jellemzően 150-220 naposan) érik el a pubertáskort, ekkor válnak ivaréretté és 6-18 hónapos korban válnak tenyészéretté. A tág határt a fajta határozza meg. Az európai fajták előbb válnak ivaréretté és átlagosan 6-8 hónapos korban tenyészéretté. Ez azt jelenti, hogy ekkortól kezdődhet az állatok tenyésztésbevétele [8].

Az ivaréérés időpontja más faktoroktól is függhet, ideértve a kanokkal való érintkezést és a stresszhatásokat is. P. E. Hughes és munkatársai ezzel a két tényezővel végeztek kísérletet annak érdekében, hogy kiderítsék, ezek milyen mértékben befolyásolják az első ivarzás időpontját. 96 db Nagy Fehér/Landrace hibridet használtak. A sertéseket külön csoportokba osztották (kontroll, csak szállítási stressznek kitett, napi 1x-i kanhatás (napi 20 perc), napi 3x-i kanhatás (napi 60 perc), kanhatásnak és stressznek is kitett csoport). A kísérletet 160 napos korukban kezdték el, majd ezt követően 40 napig folytatták. Az eredmény az lett, hogy önmagában a stressz szignifikánsan nem változtatta meg a pubertás időpontját. A kanok napi háromszori expozíciója szignifikánsan csökkentette az átlagos pubertáskori életkort a kan expozíció hiányához képest (190,2 napos kor a 202,3 napos korral szemben), míg a napi egyszeri kan expozíció közepes értéket (196,7 nap) adott. A szállítási stressz, illetve a gyakori kanhatás együttesen jobban stimulálhatja a pubertást, mint a gyakori kanhatás önmagában [9].

Az ivarérest a takarmányozás és a kondíció is nagyban képes befolyásolni. Ennek érdekében célszerű a takarmányozást úgy beállítani, hogy a napi súlygyarapodás optimális legyen. Ez fajtától függően 550-600g/nap körül van. Ha túl alacsony a napi súlygyarapodás (300g/nap), akkor akár 100 nappal is kitolhatjuk az ivarzás kezdetét. Mindegyik sertésfajtaához van egy útmutató, hogy hány naposan, hány kilogrammot kell elérnie az adott állatnak. Emiatt a következő adatok csak egy általános ajánlást mutatnak be. Célszerű lehet úgy beállítani a napi fejadagot, hogy 140 napos korra 80 kg legyen a süldőnk. Ebben az életkorban kezdjük meg a kanokkal történő stimulálást. Az 550-600 g/napos súlygyarapodást tartva 90-100 kg-os süldőket kaphatunk 160-170 napos korra, amikor az ivaréérés megkezdődhet ezen feltételek mellett. Ekkor 14-16 mm hátszalonna az ideális. A mennyiség mellett a minőségre is oda kell figyelnünk a takarmányozás terén. Fontos a megfelelő fehérjebevitel is, hiszen a nem megfelelő nitrogénforrás késlelteti az ivarérest [10].

Egy 2021-es kutatás szerint a takarmányozás kivitelezése is befolyásolja az ivarzási ciklus kimenetelét. Napi egyszeri, kétszeri és hatszori takarmányozást hasonlítottak össze. A napi egy takarmányozási csoport esetében kimutatták, hogy a vizelettel kiválasztott nitrogén mennyisége alacsonyabb volt a másik két csoporthoz képest, illetve ennek a csoportnak a tápanyaghasznosulása jobb volt a többihez képest. Az étkezés gyakorisága nem befolyásolta a hátszalonna vastagságot, a testtömeget és az első ivarzáskori életkort, ugyanakkor a 3. ciklusra a luteinizáló hormon és a 17β -ösztadiol szintje a másik két csoporthoz képest magasabb volt a ciklus 18. napján, illetve nagyobb számban, érettebb stádiumban voltak a fejlődő tüszők. Ebből azt a következtetést vonhatjuk le, hogy a tenyésztésbe behozott süldők esetén célszerűbb lehet egy olyan takarmányozási stratégiát választanunk, ahol a napi takarmányozás napi egyszeri alkalomra korlátozódik [11].

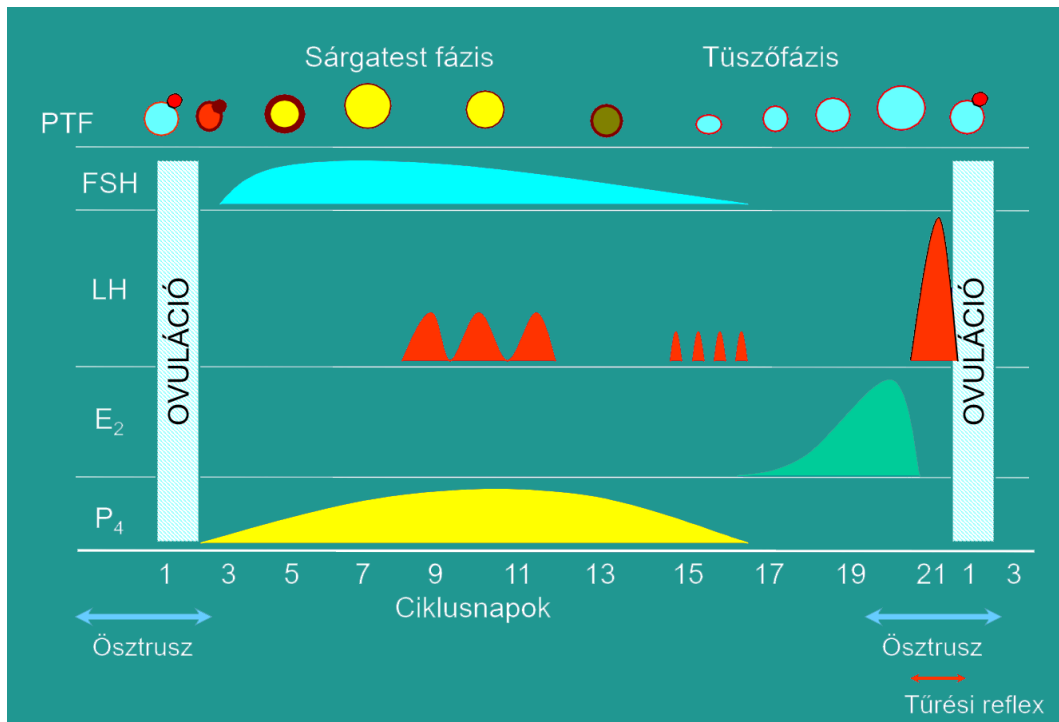
A pubertás megtörténte után 18-24 napos ivarzási ciklusok következnek (süldőkben rövidebb, 20,5-21 nap, idősebb kocákban 21-22 nap). A süldőket jellemzően a 2. vagy a 3. ciklus során termékenyítik meg. Sikeres termékenyítés után 114-116 napos vemhesség következik, melyet 16-40 napos laktáció követ. A laktáció hosszát az általunk beállított tenyésztési program, illetve a hatályban lévő jogszabályok határozzák meg. Laktáció alatt az ún. laktációs anösztrozus lép fel. Ennek kiváltója az újszülött malacok szopása, mely gátolja a hypothalamus Gonadotropin-releasing hormone (GnRH) felszabadulását. Ennek következtében a hypophysisből nem fog felszabadulni follikulus-stimuláló hormon (FSH) és luteinizáló hormon (LH). Ebből kifolyólag ekkor nincs nemi érés. A szoptatás 14-21 napja között kezd el fokozatosan termelődni az LH és az FSH. A szoptatás megszűnte nagyban növeli az LH és az FSH koncentrációt. Ekkor a follikulusok gyors növekedésbe kezdenek. Ezzel párhuzamosan az ösztrogén szint is növekszik a vérben. A választást követő 4-7. napon történik az újbóli termékenyítés vagy ha az elmarad, akkor ezután következik az újabb ciklus [10] [12].

A nemi ciklus két ivarzás között eltelt idő neve, melyet a következő hormonok befolyásolják. A ciklus során végbemenő hormonális változásokat, és azok tüszőkre gyakorolt hatását az 1. ábra szemlélteti. A hipotalamuszból felszabaduló GnRH, az agyalapi mirigyből felszabaduló FSH és LH, a petefészekben termelődő progeszteron (P_4), 17β -oestradiol (E_2), inhibinek, relaxin és a méhben termelődő prostaglandin $F_{2\alpha}$ ($PGF_{2\alpha}$). Ezek a hormonok negatív és pozitív feedback alapján termelődnék, vagyis képesek egymás termelődését növelni vagy csökkenteni. A sertés az emberekhez és a szarvasmarhákhoz hasonlóan polioestrusos, vagyis egész évben, fiziológias esetben, megállás nélkül követik egymást a ciklusok ennél az állatfajnál.

A nemi ciklus két fő szakaszra osztható, a tüszőfázisra (2-4 nap) és a sárgatest fázisra (10-14 nap). Ezt a két fő szakaszt további kisebb szakaszra lehet osztani a hormonok termelődése alapján. Ennek következtében jobban átláthatjuk, hogy mi is történik az egyes szakaszok során. A tüszőfázis alatt zajlik le a prooestrus és az oestrus, a luteális fázis alatt a metoestrus és a dioestrus.

A prooestrus alatt kezdenek el a follikulusok növekedni. A follikulusok növekedésének köszönhetően az általuk termelt ösztrogén termelése is növekszik. Ezzel párhuzamosan az agyalapi mirigy alacsony koncentrációban, 2-3 napig tartva alacsony amplitúdójú, sűrű hullámok formájában LH-t bocsát ki a véráramba, mely negatív visszacsatolásként fog hatni a GnRH és az LH termelésre. Miután a follikulusok által termelt ösztrogén koncentrációja meghaladja a küszöbértéket, a sertéseknél jelentkeznek az ivarzás jellegzetes tünetei. A nemi ciklus 0. napja egybeesik az ivarzással vagy más néven az oestrusszal. A nőstények ekkor hajlandóak elfogadni a hímek közeledését. A magas ösztrogén szintnek köszönhetően alakul ki az LH csúcs, amelyet az ovuláció fog követni 34-36 óra elteltével. Az ovuláció közvetlen oka a már átalakuló sárgatestekből felszabaduló progeszteron. Ennek a hormonnak lokális érösszehúzó hatása van, ami a tüsző lelökődését fogja eredményezni a petefészekről. A többi állatfajjal ellentétben a sertések tüszőrepedése a tüsző apicalis végén történik.

Ezután jön a metoestrus szakasza. Az ovuláció után üres üregek maradnak vissza, melyet vérárvadék tölt ki, ez a corpus haemorrhagicum. A korábbi LH csúcsnak köszönhetően a Graaf-tüsző theca- és granulosa-sejtjei luteinsejttekké, majd sárgatestté alakulnak (corpus luteum), és fokozatosan progeszteront kezdenek el termelni. Ez az ovulációt követő 5-6. napon válik teljessé. A corpus luteum fiziológiásan halvány rózsavörös, rugalmas tapintatú. Az ezt követő időszak már a dioestrus szakaszába tartozik. Ez 10-14 napig tart, és ekkor túlnyomó többségben a progeszteron termelése zajlik. A sárgatestek fennmaradásáért nagyobb amplitúdójú, de kisebb frekvenciájú LH leadása felel. A dioestrus végén ezek a hullámok alacsony amplitúdójú, de sűrű hullámokká alakulnak. Ennek lesz köszönhető, hogy a méhben a PGF2 α koncentrációja növekedni fog. Ez a hormon eredményezi a sárgatest sorvadását. Ha nem történik termékenyülés, akkor a sárgatest esetében corpus luteum periodicumról beszélünk, és a ciklus végén átalakul corpus albicanszá, ami tulajdonképpen egy visszamaradó hegszövet. Ezt követően a nemi ciklus kezdődik előlről [7] [12].



1. ábra: Az ováriumban történő változások a nemi ciklus során [7]

2.3. Asszisztált reprodukciós technikák (ART)

Az asszisztált reprodukciós technológia különböző eljárásait az állatállományban a genetika javítása és megőrzése, valamint a reprodukciós hatékonyság növelése érdekében alkalmazzák [13]. Jelenleg a sertésstenyésztésben a mesterséges termékenyítés (MT) a legelterjedtebb. Ez az eljárás az apai genetika gyors elterjedését segíti elő az utódokban [7]. Ugyanakkor az elmúlt évtizedben a sertés embriótranszfer (ET) is rohamos mértékben fejlődött köszönhetően az új technológiáknak. Ennek jóvoltából már az anyai genetika is könnyebben rögzíthető az utódokban [14]. Manapság egyre több kutatás zajlik in vitro- és in vivo fertilizációs (IVF) embrió előállításával, ugyanis az emberhez hasonló élettani hasonlóságok miatt az in vitro és számos in vivo előállított embrió alkalmas összejtek kinyerésére a kutatólaboratóriumokban. Emellett az IVF-s eljárás transzgenikus állatok előállítására is alkalmazhatók. Mindezek mellett legújabbban azzal a céllal nyúlnak ehhez az eljáráshoz, hogy az így előállított embriók szerveit xenotranszplantációra használják fel [13].

Ebben az alfejezetben főleg ezekre az eljárásokra szeretnék részletesen kitérni.

2.3.1. Mesterséges termékenyítés (AI)

Globálisan az 1990-es években következett be a mesterséges termékenyítés forradalmának a kezdete. Ekkor döbbsent rá a Föld számos országa, hogy más fajokhoz hasonlóan a sertések genetikai fejlődésének üteme drámaian megnövelhető AI alkalmazásával. Ezt mutatja az is, hogy 1990-ben az átlagos alomszám 80-90% ellési arány mellett 11 és 13 között volt, ez a szám 2014-ben 86%-os ellési arány mellett már 14 malacra nőtt. Ez a genetikai fejlődés az alkalmazott AI technológiának, az állandó minőségellenőrzésnek és a reprodukciós teljesítmény nyomon követésének tudható be [15].

A mesterséges termékenyítés első célja a betegségek átvitelének kiküszöbölése volt, emiatt vezették be a sertésstenyésztésbe. Ezzel párhuzamosan a termelők felismerték, hogy az AI technika növelheti a munka hatékonyságát, és felgyorsíthatja a genetikai fejlődést[16]. Jelenleg a mesterséges termékenyítést (Artificial Insemination, AI) alkalmazzák az esetek 90%-ában mindazokban az országokban, ahol a sertésstenyésztés az elsődleges a többi hústermelő ágazattal szemben. Mindez azért van, mert jelen állás szerint a kansperma hibernálására szolgáló módszerek korlátozott hatékonysággal állnak a rendelkezésünkre, emiatt ezeket az eljárásokat még nem alkalmazzák rutinszerűen a sertésstenyésztésben szemben más állatok (pl. szarvasmarha) tenyésztésében[17]. Emiatt szakdolgozatomban főleg az AI technológiáját szeretném bemutatni, és ennek szeretném részletezni a jelenleg legmodernebb aspektusait.

2.3.1.1. Spermagyűjtés lehetőségei, kivitelezése

A spermagyűjtés mesterséges termékenyítő állomáson történik. Egy-egy telephelyen általánosságban 25-től akár 2000 kanig terjedő számban vannak a kanok elhelyezve. Ezek a telephelyek általában 20-200 gazdaságot látnak el. A tenyész telepek sikere a sperma termékenységen és minőségén, valamint az állomáson lévő kanok genetikai értékén múlik. Ugyanakkor az ittlévő sertéseket viszonylag gyakran kell selejtezni a felmerülő agresszió, a kivitelezhetetlen spermagyűjtés, a gyenge spermatermelés, a lábproblémák, valamint a gyors genetikai fejlődés miatt.

A kanokat 7 hónapos koruktól kezdve tanítják a fantom használatára. Ez általában 2 héten át tart. Általában 8-9 hónapos korban kerülnek termelésbe, ha a spermavizsgálatuk során megfelelőnek tartották őket a spermatermelésre. Kezdetben hetente egyszer vesznek le tőlük örökítőanyagot, de ezt a későbbiekben úgy változtatják, hogy 4-5 pihenőnapot iktassanak be két levétel közé. Mindez a sperma minőségének és mennyiségének optimalizálása érdekében történik. Egy átlagos sperma 60-120 milliárd spermiumot tartalmaz [18].

Az ejakulátum 3 fő fázisra tagolható. Az első fázis csak kevés spermiumot tartalmaz. A főfázis 50-100 millió db/ml spermiumot, az utófázis egy sűrű mukózus folyadékot foglal magába, amely meggátolja a sperma visszafolyását a természetes termékenyülés során. Nekünk csak a főfázist érdemes felfognunk a spermalevétel során [7].

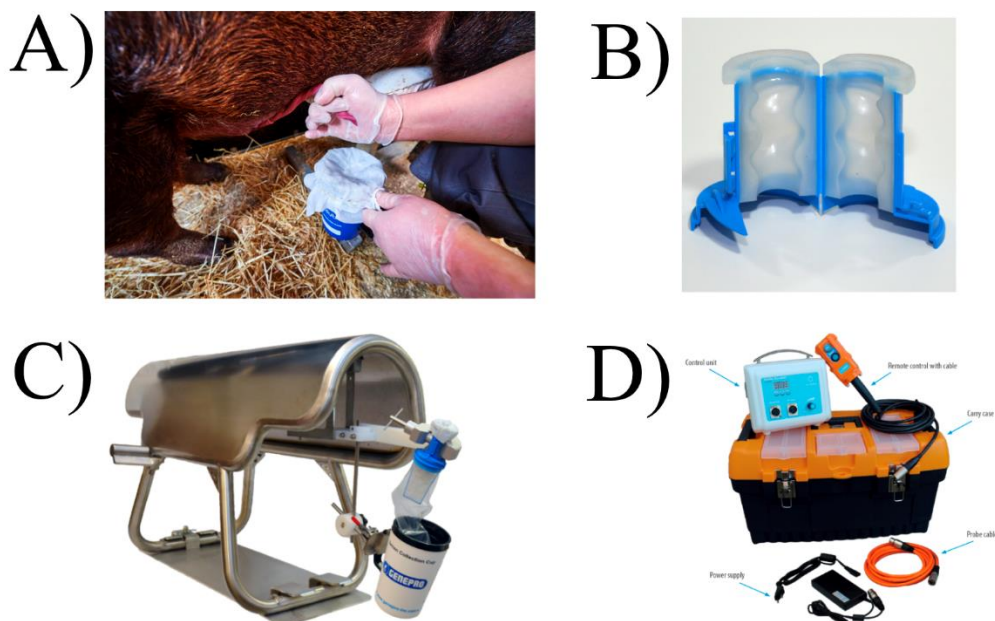
A spermavétel az elmúlt lassan száz évben nem igazán változott. A kézzel történő spermavétel (az ún. gloved hand technika) a leggyakrabban alkalmazott módszer. Előnyeihez tartozik, hogy egyszerűen lehet alkalmazni, nagyon olcsó, nem igényel tisztítást, illetve sterilizést sem szemben a műhüvelyes technikával. Ugyanakkor oda kell figyelni ennél és a többi módszernél is, hogy ne használjunk latex tartalmú kesztyűt, ugyanis már több kutatás is bebizonyította, hogy ez az anyag rontja a sperma minőségét. Emiatt használjunk inkább vinil vagy egyéb anyagból készült gumikesztyűt.

G. J. King és J. W. Macpherson kutatásukban összevetették a „gloved hand” és a műhüvelyes módszert. Eredményül azt kapták, hogy a két módszer között nincs szignifikáns különbség. Mindkét módszerrel ugyanannyi mennyiségű spermát lehet levenni az állattól. Mindezek tudatában megfontolandó, hogy érdemes-e plusz pénzt kiadni a műhüvelyre [19].

A jól bevált „gloved hand” módszer mellett a mai napig fejlesztenek újabb és újabb eszközöket, amelyek a sperma korszerűbb levételére szolgálhatnak a jövőben. Mindennek a háttérben a munkaerőhiány áll, illetve, hogy a kantenyésztők folyamatosan keresik a munkaköltségek csökkentésének a módját. Ma már léteznek automata sperma gyűjtő rendszerek. Egy 2008-as kísérletben vizsgálták az ejakuláció megkezdéséhez szükséges időt, az ejakuláció hosszát, a sperma mennyiségét, koncentrációját, a spermiumok motilitását, a baktériumok számát. Szignifikánsan nem különbözött a kétféle módszer. A cikk írója azt valószínűsíti, hogy az automata módszerrel a későbbiekben csökkenni fog a sperma baktérium szennyezettsége, ezáltal növekedni fog a sperma minősége, ugyanis az automata módszer kevesebb hibalehetőséget takar, mint a kesztyűs eljárás. A kesztyűs technikával szemben az automata módszernek a legnagyobb előnye, hogy 70%-kal kevesebb munkaerőt igényel, illetve sokkal biztonságosabb alkalmazni, mint a hagyományos műhüvelyes vagy a kesztyűs eljárást [20].

Elektroejakulációs technikát csak ritkán alkalmaznak. Ennek egyik hátránya, hogy általános anesthesia mellett lehet csak alkalmazni, illetve, ha nem megfelelően alkalmazzák, akkor felesleges stressznek teszik ki az állatokat. Ez a módszer főleg akkor jön szóba, ha mind a vadon élő állatok, mind az állatkerti, fogságban tartott fajok genetikai anyagainak megőrzése kritikus fontosságú, ha a genetikai diverzitás javítása és a veszélyeztetett fajok fennmaradásának a meghosszabbítása a cél [21].

A fent említett módszerekhez használt eszközöket a 2. ábra szemlélteti.



2. ábra: Spermavételi eszközök: A) Kézi spermavétel B) Műhüvely C) Automata sperma levő berendezés D) Elektroejakulátor [22] [23] [24] [25]

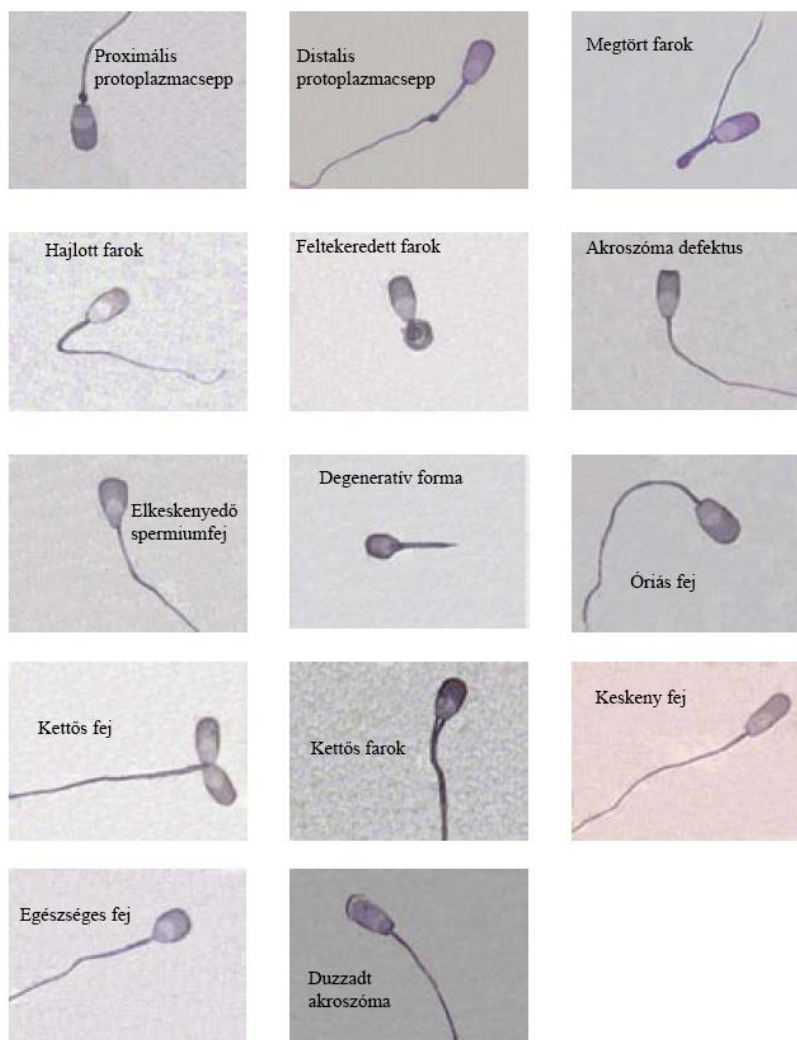
Fontos, hogy a spermalevétel után a levett ondó a lehető legkevesebb ideig érintkezzen a levegővel. Kísérletben bebizonyították, hogy a levegővel többet érintkezett sperma motilitása és életképessége alacsonyabb, mint a minimális levegőkontaktussal érintkező kontrollé. A spermiumok mozgékonyasága ebben a vizsgálatban összefüggésbe volt hozható a levett adagok pH-értékének változásával. A friss kan ejakulátum ideális pH-tartománya 7,2 és 7,5 között van. A 7,3 alatti pH-érték általában kedvező. Ha több levegő van a spermaadagoló csőben, az a hígított sperma bázikusságának növekedését okozhatja, ami káros a spermiumok mozgékonyaságára és életképességére [26].

2.3.1.2. Sperma bírálat és tárolás

Miután megtörtént a spermalevétel, a felfogott spermának alapos vizsgálatokon kell átesnie. Kezdő lépésként érzékszervi vizsgálatot hajtanak végre a levett spermán. A fiziológiás színe szürkésfehér. Magasabb spermakoncentráció mellett a fehér szín erőssége nő. Az ettől eltérő szín gyulladásra, vérrrel való szennyeződésre utal. A normálistól eltérő erős szag betegségre, egyéb anyaggal történő szennyezettségre utal. A spermiumok progresszív

előrehaladása 65-70% feletti. A központi kantelepeken ennél magasabb számokkal dolgoznak [7].

Az érzékszervi vizsgálat után mikroszkópos vizsgálatnak kell alávetni a spermiumokat. Ezzel megfigyelhetjük a spermiumok morfológiáját. Az abnormális spermiumok aránya maximum 10-20% között fordulhat elő. Ezen belül az acrosoma rendellenességek maximum 2-3% lehet [7]. A mikroszkóposan detektált morfológiai hibáknak egy része a 3. ábrán láthatók.



3. ábra: Mikroszkóp alatt látható morfológiai hibák [27]

Az áramlási citometria (FC) és Computer-assisted sperm analysis (CASA) fontos módszerek a mikroszkópos értékelés mellett, amelyekkel a sperma paraméterei objektíven értékelhetők. A két technológia az utóbbi években rohamosan fejlődött, és egyre pontosabb értékeket tudnak adni. Az FC és a CASA kombinációja lehetővé teszi a spermiumok működésének többparaméteres értékelését. Az áramlási citometria lehetővé teszi a sérült

membránú spermiumok detektálását. Életképes spermiumhoz ép membrán szükséges. Különböző DNS-t megszínező festékeket alkalmazva a sérült membránon bejutott festék az áramlási citometriával detektálható. Vannak külön olyan festékek, melyek a jelenleg apoptózison áteső sejteket mutatja ki. Egyes növényi lektinokkal (pl. *Pisum sativum*) vagy agglutininekkel az acrosoma integritását mutathatjuk ki. Áramlási citometriával a sejten belüli oxidatív stresszt is mérhetjük a mitokondriális membránpotenciál (MMP) változásának mérésével. Kutatók megfigyelték, hogy minél nagyobb oxidatív stressznek vannak a spermiumok kitéve, annál inkább csökken a motilitásuk. A spermiumok intracelluláris pH-értékét az életképesség és a működés jelzésére is használják. Az intracelluláris pH-t összefüggésbe hozták a spermiumok mozgékonyágával és az akroszóma reakcióval. Ma már képesek vagyunk az intracelluláris pH-t is megmérni különböző membránon átdiffundáló, majd ott az intracelluláris pH hatására megváltozó anyag segítségével (pl. 2',7'-bisz-(2-karboxi-etil)-5-(és-6)-karboxi-fluoreszcein) [28].

A mesterséges termékenyítő állomáson a spermafeldolgozás során a baktériumok ellenőrzése kiemelt fontosságú, mivel a begyűjtött ejakulátumok egy része várhatóan valamilyen szinten szennyezett lesz. Világszerte aggodalomra adnak okot az olyan fertőző baktériumok, mint a *Brucella*, a *Chlamydia* és a *Leptospira*, amelyek a spermában történő átvitel révén okoznak megbetegedést. Egyéb baktériumok a sperma minőségét ronthatják [18]. A baktériumok többsége, melyek a spermába kerülhetnek, mind ott vannak a sertések ürülékében, bőrén és szőrén. Innen képesek a levett spermába is bekerülni. Emellett a már levett mintákból más környezeti baktériumokat is kimutattak, amelyek a feldolgozási területről származtak. Gyakran Gram-negatív baktériumok tenyésztethetők, beleértve az *Enterobacteriaceae*-t, amelyek a környezetben és a víztisztító rendszerekben élnek. Ezek a baktériumok mind morfológiai, mind motilitásbeli változást idézhetnek elő. Mindezen baktériumok negatív hatásainak elkerülésére alkalmaznak a sperma hígítókból antibiotikumokat, illetve pH csökkentő adalékanyagokat.

A minimális szennyeződés érdekében célszerű a következő lépéseket betartani a sperma levételekor:

- a) A preputiális szőrt a preputiális nyílás környékén le kell nyírni.
- b) Dupla kesztyűt kell használni. A külső kesztyűt el kell dobni a kan előkészítése után, ezzel lehetővé téve, hogy a tiszta kesztyűs kézzel fogjuk meg a péniszt.

- c) A spermagyűjtés során eldobható vinil kesztyűt vagy kézfertőtlenítőt kell alkalmazni a sperma szennyeződésének minimalizálása és a kanok közötti keresztfertőzés kockázatának csökkentése érdekében.
- d) Meg kell tisztítani a preputiális nyílást és a körülötte lévő bőrterületet egyszer használatos, eldobható törlőkendővel.
- e) A preputiális folyadékot távolítsuk el manuálisan, mielőtt a szement begyűjtenénk.
- f) Tartsuk a hímveszőt merőlegesen a kanra, hogy minimalizálja a sperma és a spermagyűjtő edény preputiális folyadékkal való szennyeződését.
- g) El kell távolítani a prespermium frakciót és a gélfrakció kezdeti sugarait a spermagyűjtő edényből.
- h) Ki kell dobni az egyszer használatos eszközöket, mielőtt az összegyűjtött spermát továbbítanánk a laboratóriumba a további feldolgozás céljából.

Fontos a laboratóriumi és istállóhigiénia a spermafeldolgozás során:

- a) A keresztaszennyezések minimalizálása érdekében alkalmazzunk egyszer használatos termékeket.
- b) Ha újrahasznosítható laboratóriumi eszközöket (pl. üvegedények, műanyag edények, műanyag csövek, tartályok stb.) használunk, akkor ezeket használat után sterilizáljuk forralással vagy maradékmentes laboratóriumi tisztítószerrel, majd desztillált vízzel, és végül 70%-os nem denaturált alkohollal. Figyeljünk a behatási időre.
- c) A feldolgozás után, a nap végén fertőtlenítsük a munkalapokat és a szennyezett laboratóriumi berendezéseket nedves, maradékmentes mosószerrel és öblítővel.
- d) A padlót a nap végén fertőtlenítőszerrel (pl. fenolos, formalinos termékkel) fel kell mosni.
- e) A nagyobb kiserelésű termékeket felbontás után azonnal osszuk szét napi használatra alkalmas kisebb mennyiségekre.
- f) Ultraibolya világítást is alkalmazhatunk az újrahasznosítható eszközök fertőtlenítése céljából. Azonban ezek használata mellett biztonsági óvintézkedéseket kell előírnunk a személyzet expozíciójának elkerülése érdekében.
- g) A kanállomásokat olyan tisztítási és fertőtlenítési protokollnak kell alávetni, amely minimalizálja a szerves anyagok és a felületi nedvesség felhalmozódását.
- h) A spermagyűjtő területet és a fantomot minden spermagyűjtési nap végén alaposan meg kell tisztítani és fertőtleníteni [29].

A megvizsgált spermához meghatározott összetételű hígítót adnak a spermiumok minőségének megőrzése érdekében. Ezek a hígító folyadékok tartalmazzák az antibiotikumok mellett a spermiumok fennmaradására szolgáló tápanyagokat. Emellett kísérleteznek olyan adalékanyagok alkalmazásával, amelyek a termékenyítést elősegítik. 2019-ben megjelent egy tanulmány, amely szerint a spermiumokhoz adott buzzerelin (GnRH agonista) csökkentheti a forró, meleg hónapokban mutatott kocák általi szezonális meddőséget. Kísérleteztek még kloporsztenollal (PGF analóg) és oxitocinnal is, de a legjobb fertilitási eredményeket a buzzerelinnel érték el [30].

Bár A Bizottság (EU) 2023/647 Felhatalmazáson Alapuló Rendelete kijelenti, hogy a felesleges antibiotikum felhasználást csökkenteni kell a háziállatok spermájának gyártásában és körültekintően kell azokat alkalmazni, ugyanakkor a rendelet III. mellékletében kitér, arra hogy a szarvasmarhák és a sertések esetében antibiotikumok és antibiotikum-keverékek alkalmazhatók[31]. Mindezek ellenére a szakemberek az antibiotikumok korlátozása érdekében próbálnak olyan megoldásokat találni, amellyel az antibiotikum felhasználást képesek lehetnek csökkenteni. Más háziállatok mesterséges termékenyítésénél bevett gyakorlat, hogy a spermát 5 °C-on tárolják. Ezt azonban sertéskanoknál nem lehetett eddig kivitelezni, mivel a kansperma fokozottan érzékeny a hűtésre. Emiatt a sertés AI-e során a 16-18 °C-os tárolás vált elterjedtté, mivel olyan töltőanyagokat fejlesztettek ki, ami ezt lehetővé tette. Ezzel a technológiával akár egy hétig is lehet a spermát tárolni [32].

A *Serratia marcescens* és a *Klebsiella oxytoca* (és más baktériumok) antibiotikum gyógyszerekkel szembeni rezisztenciája egyre nő, ami veszélyt jelent a sertések szaporodására és a környezetre. Kísérletben megfigyelték, hogy 144 órás 5 °C-on történő tárolás gátolja mindkét baktériumfaj növekedését, és fenntarja a spermium minőségét, míg a pozitív kontrollként használt 17 °C-os mintákban a baktériumszám 10^{10} CFU/ml fölé emelkedett[33]. Mindezek miatt egyre többen kutatják annak a lehetőségét, hogy az 5 °C-on történő tárolás megvalósulhasson. EU-n kívüli országokban, ahol nincs előírva az antibiotikumok kötelező felhasználása a sperma előállításához már több olyan kísérletet is végeztek, melyeknek az eredménye pozitívnak ígérkezett. 5 °C -on tárolt, antibiotikum mentes spermákat és 17 °C-on tárolt antibiotikumos spermákat hasonlítottak össze post-cervicális AI technikával. Az eredmény meglepő volt, ugyanis sem az ellési arányban, sem az almok méretében nem volt jelentős különbség. Az 5 °C-on történő sikeres spermatároláshoz elengedhetetlen a megfelelő sperma hígító használata. Ezeknek a hígítóknak olyan anyagokat kell tartalmaznia, melyek megvédik a spermium külső membránját a hideg behatástól. Ilyen pl. a Androstar Premium (Minitüb GmbH, Tiefenbach, Germany), amely lehetővé teszi a sperma tárolását 5 és 25 °C

között. A megfelelő hígító kiválasztása mellett fontos, hogy a hűtés lassan, fokozatosan menjen végbe, hogy a sejtmembránban található lipidek megfelelően át tudjanak alakulni. A spermát a jelenlegi 17 °C-os gyakorlatnak megfelelően lehet szállítani és begyűjteni, majd ezt követően a gazdaságban 5 °C-on tárolni. Vagyis az új eljáráshoz nem kell plusz eszközökre fektetnünk. Hogy ezt meg tudjuk valósítani, arra kell odafigyelnünk, hogy a 17 °C-on történő tárolás ne haladja meg a 16-24 órát, ugyanis e fölött a baktériumszám rohamosan kezd növekedni. A tárolás során 0,04 °C/perc sebességgel 5 °C-ra kell hűteni a mintát. A felhasználás helyére történő szállítás mehet 17 és 5 °C-on is, bár bebizonyították, hogy az alacsonyabb hőmérsékleten kevesebb stressznek vannak kitéve a spermiumok [32].

A sertés kan ejakulátuma viszonylag nagy mennyiségű és alacsony sperma koncentrációjú. Emiatt a mélyfagyasztáshoz elengedhetetlen, hogy a spermát a fagyasztás előtt koncentrálják. A koncentrálás mellett egyéb anyagokat is hozzá kell adni a spermához, ezek az ún. hígítók. Sokáig glicerolt alkalmaztak ezekben a hígítóknak, amit a szarvasmarha spermiumával ellentétben a sertés kan spermiumok nem tudtak tolerálni. A glicerol hatására a spermium sejtmembránjának áteresztő képessége megváltozik, melynek következtében a spermium szétesik. Emiatt nehéz kivitelezni a spermiumok mélyfagyasztását [34].

2.3.1.3. Ivarzás beindítása és ivarzásszinkronizáció

A sertésiparban elengedhetetlen, hogy a malacok azonos időben legyenek választva, minél több malac legyen választva évente, illetve cél, hogy az állomány egységes legyen mind genetikai, mind fenotípusos szempontból. Emiatt fontos, hogy a sertések lehetőleg egyszerre legyenek termékenyítve, ehhez szükséges az ivarzásszinkronizáció.

A kocák és a kocasüldők ivarzásszinkronizációja különbözik, mivel a süldők esetében a ciklust szeretnénk elindítani, a már fiatal kocák esetében pedig a választás utáni újabb tüszőérést szeretnénk támogatni abból kifolyólag, hogy minél kevesebb legyen az üres napok száma, így ne legyen kiesés a termelésből.

Az utánpótlás céljából tenyésztésbe helyezett kocasüldőket 150-180 naposan választják külön társaiktól. Ekkor kezdődik meg a kanokkal való expozíció. Általában ez napi egyszer 20 percet tesz ki, de már korábban említettem, hogy a napi többszöri (háromszor 20 perc) kankontaktus eredményesebbnek bizonyul az ivarzás beindításában. Többször nem érdemes naponta véghez vinni, mert akkor a süldők hozzászoknak a kan látványához valamint illatanyagához, és akkor elmarad a várt hatás. Ez az expozíció 10-20 napon belül kiváltja az

ivarzást a kocasüldőkben. Tanulmányok szerint, minél korábban kezdjük meg a kanokkal történő kontaktot, annál tovább maradnak a sertések a termelésben [35] [36].

A ciklusba lendült kocasüldők ezután a tenyész istállóba kerülnek, hogy az inszeminálás előtt hozzászokjanak a létesítményhez, ezzel csökkentve a stresszt.

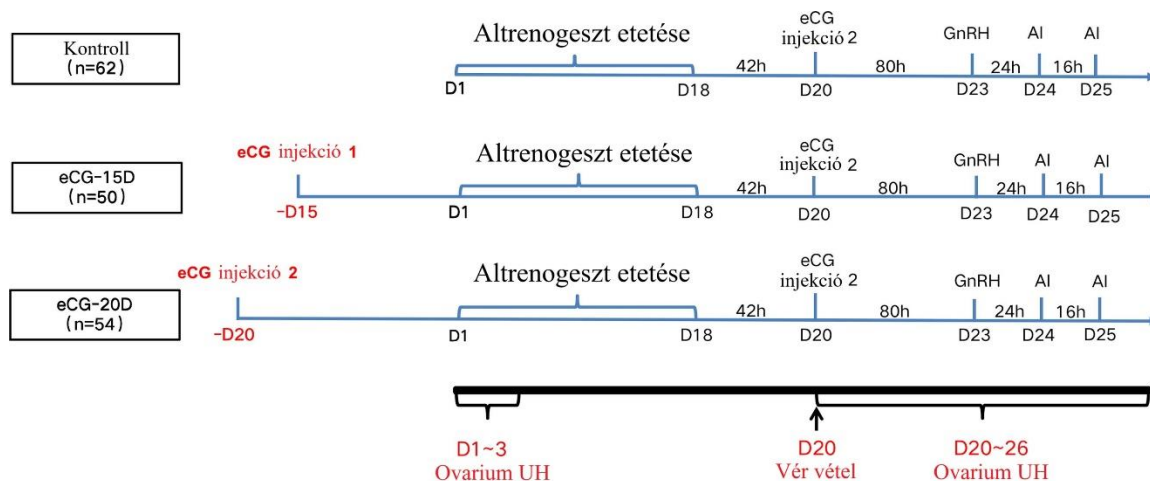
Aciklikus és ciklusban lévő sertések esetén más-más módszerrel avatkozunk be a nemi ciklus hormonális szabályzásába.

Ha tömegesen fordulnak elő aciklikus egyedek, akkor célszerű először a probléma forrását felderítenünk, mert hosszútávon időt és pénzt spórolhatunk meg vele. Ugyanakkor átmeneti megoldást jelenthet a sertések gonadotrop hormonnal történő kezelése. Ehhez javasolt 400 NE eCG + 200 NE hCG = P.G. 600 alkalmazása. Ezt a kezelést használhatjuk olyan süldőkön, melyek már elérték az ivarérési kort (> 7 hónaposak), de még nem ivarzanak. Emellett olyan kocáknál, amelyeknél a választás már megtörtént, de az ezt követő újra ivarzás elmaradt. Nyári meddőség esetén is próbálkozhatunk ezzel.

Ciklusban lévő sertések nemi ciklusának szinkronizálását progesztagénnel végezhetjük. Ehhez kiválasztjuk azokat a süldőket, amelyek már átestek a megfelelő számú ivarzáson, majd ahhoz, hogy szinkronba kerüljenek, 15-18 napon keresztül napi 15-20 mg altrenogeszt alkalmazásával meghosszabbítjuk a sárgatest fázisukat. Így, amikor abbahagyjuk a kezelést, egyszerre fog a ciklusuk diösztruszról proösztruszba kerülni. A már ellett kocáknál ezt a lépést kihagyhatjuk, náluk a szoptatás egyszerre történő abbahagyása fogja a szinkron ovulációt kiváltani. Mindkét esetben annak érdekében, hogy tökéletes legyen a szinkronizáció eCG-t és hCG-t adunk az állatoknak. A választás után vagy a kocasüldők esetében az altrenogeszt abbahagyása után 24 órával 500-1000 NE eCG-t adunk. Az eCG-nek FSH szerű hatása van a szervezetben, így ez a hormon lesz az, amivel a folliculusokat stimuláljuk. Majd ezután 72-80 óra elteltével 500 NE hCG injekciót adunk. A hCG-nek LH hatása van, ezzel a hormonnal fogjuk az ovulációt stimulálni. Az ovuláció kiváltására GnRH analóg anyagot is alkalmazhatunk. Ezután az első termékenyítést 24-26 órával, a második termékenyítést ezt követően 10-14 órával végezzük el [7].

Zhao és munkatársai kutatást végeztek tenyésztésbe vételre váró süldőkkel. Arra keresték a választ, hogy hogyan lehetne minél pontosabban optimalizálni a már meglévő termékenyítési protokollt annak érdekében, hogy a jobb reprodukciós teljesítményt érjünk el. A csapat a fent említett hagyományos termékenyítési eljárást gondolták tovább. A süldők, amelyekkel kísérleteztek, 190 naposak és kb. 90 kg Nagy Fehér és Landrace hibridek. Volt egy kontroll csoport, egy csoport, amelynek 15 és egy csoport, amelynek 20 nappal a termékenyítési program megkezdése előtt adtak eCG-t. A jobb átláthatóság érdekében a 4. ábra szemlélteti,

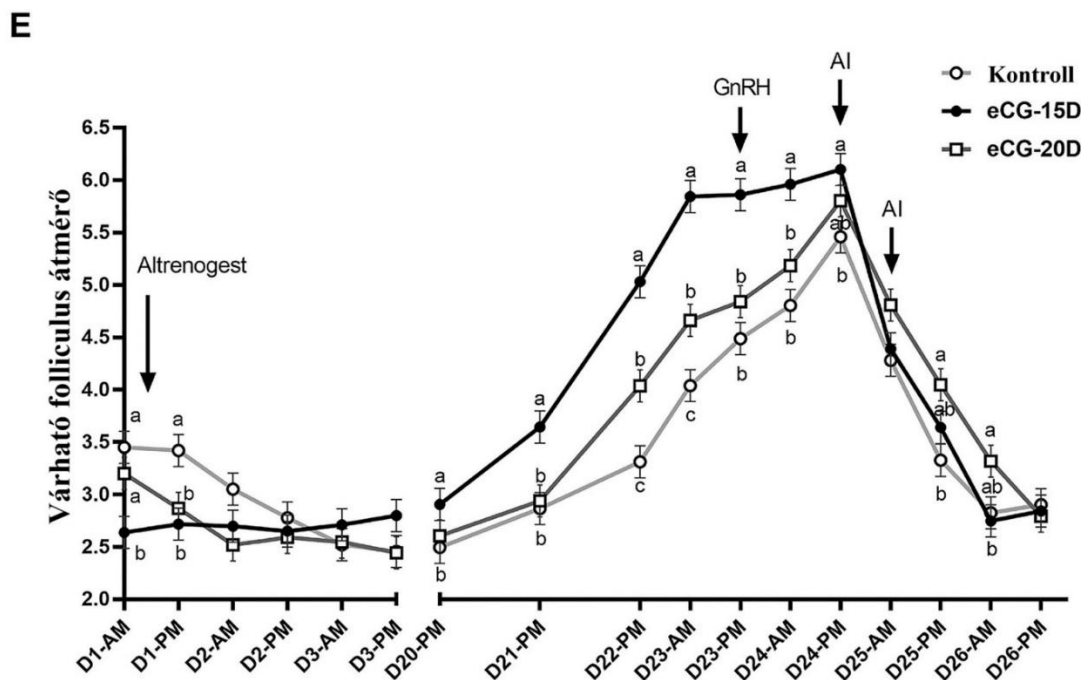
hogy az egyes csoportok tagjainak mikor, milyen hormont adtak be. A 15 és a 20 nap elteltével mindhárom csoporton ugyanazt a hagyományos termékenyítési protokollt hajtották végre. 18 napon keresztül altrenogesztet adtak szájon át a sertéseknek. Ezután 42 órával az altrenogeszt abbahagyása után 1000 NE eCG-t, majd 80 óra elteltével 100 µg GnRH-t adtak be nekik. Ezután 24 órával később történt az első termékenyítés, majd 16 órával később a második. Eredményül azt kapták, hogy annál a csoportnál, amelynél 15 nappal a hagyományos tenyésztési program előtt adtak eCG-t, ott a termékenyítés előtti tüszőátmérők nagyobbak voltak a másik két csoportnál. Ennél volt a legtokéletesebb a szinkronizáció, a süldők 100%-a ovulált már a második termékenyítés előtt. Ebben a csoportban volt a legmagasabb a vemhesülési arány (92%), az ellési arány (90%), a születési szám (11,59) és az élve születettek száma (11,18).



4. ábra: A három kísérleti csoport beavatkozásai időrendi sorrendben [37]

De miért pont a 15 napos csoportnál kaptak jobb termékenyítési mutatókat? Megfigyelték hormonális és ultrahang vizsgálatokkal, hogy a 15 napos kezelés esetén az altrenogeszt adása előtt luteális fázisban voltak a tüszők, a 20 napos esetében follicularis fázisban, míg a kontroll csoportban mindkét fázisban vegyesen. Az altrenogeszt kezelés után mindhárom csoport tüszői 3 mm alá csökkentek a progeszteron szerű hatásnak köszönhetően, az altrenogeszt elnyomta a képződő kis és közepes tüszőket. Ahogy az várható volt, a 15 napos csoportnak volt a legnagyobb tüsző átmérője az altrenogeszt elhagyása után, a második eCG injekció beadása idején. Ezt az 5. ábrán is nyomon követhetjük. A második eCG beadását követően mindhárom csoport tüszői növekedésnek indultak. Az előzőekből kifolyólag a 15 napos csoport esetében szignifikánsan magasabb volt a tüszőméret az első termékenyítésnél, mint a másik két csoportban. Azt is megfigyelték, hogy ennél a csoportnál az ovuláció az

altrenogeszt első adását követő 25. napon mindegyik egyednél sikeresen lezajlott, míg a másik két csoportnál ez a többi napra szétszóródott. Ennek köszönhetően a két termékenyítés során ezeket az egyedeket sikeresebben lehetett termékenyíteni [37].



5. ábra: A beadott hormonok hatása a folliculus átmérőjére a különböző csoportokban [37]

E kutatás alapján tehát célszerű eCG-val kezelnünk a süldőket az altrenogeszt beadása előtt 15 nappal, annak érdekében, hogy javítsuk a reprodukív teljesítményt.

2.3.1.4. Az ivarzás detektálás módszerei

Hátalási próba

Az ovuláció idejének előrejelzése az egyik legfontosabb és egyben legnehezebb folyamat a sertésenyésztésben, mivel jelentős hatással van az állomány termékenysége és az alom méretére. Az ivarzás időtartama kocánként 24 órától 96 óráig változhat. Ez nincs összefüggésben a szisztémás ösztrogénkoncentrációval. Az ovuláció az ivarzás kezdete után 10 és 85 óra között következhet be. Következésképpen az ivarzás kezdete nem jó előre jelzője az ovuláció időpontjának. Ugyanakkor az ivarzás detektálása az egyik legelterjedtebb módszere az ovuláció előrejelzésének, mivel az ovulációk 70%-a az ivarzás időtartama alatt következik be. Az ivarzó egyedeket a legegyszerűbben a hátalási próbával lehet kiszűrni. A pozitív tűrés reflex esetén lehet csak megkezdni az inszeminálást [38] [7].

Ahhoz, hogy ezt a tűrési reflexet minél eredményesebben mutassák, célszerű a kocák kutricája előtt egy kant felvezetni, illetve kansprayt alkalmazni. A kanspray feromonokat tartalmaz. A feromonok az állatok vizeletében vagy ürülékében felszabaduló, illetve a bőrmirigyekből kiválasztódó, a szaglórendszer által érzékelt, levegőben terjedő kémiai anyagok („jelek”), amelyek viselkedési és endokrin reakciókat váltanak ki a fajtársakban. A kan pusztája jelenléte a koca termékenyítésekor, illetve a kanspray javítja a spermatranszportot és az ovulációt [39].

Dimetilarginin-dimetilaminohidroláz 2 (DDAH2), mint lehetséges ösztroz detektáló marker

Az ivarzás időpontjának pontos meghatározásához ösztroz-specifikus nyálkahártya-fehérjék kimutatását is alkalmazhatunk. A dimetilarginin-dimetilaminohidroláz 2 (DDAH2) egy olyan nyálkahártya fehérje, amely 3,6-szer nagyobb koncentrációban van jelen proösztrozban, mint ösztrozban. A DDAH2 a nitrogén-oxid-szintáz (NOS) metabolizmusáért felelős kulcsenzim. A NOS felelhet a méh ereinek tágításában, de ezt nem vizsgálták részletesen még kocák méhében, de más szövetekben és az emberi méhben is értágító hatása van. A proösztroz ideje alatt a méh értágulata aktív, hogy felkészüljön az ovulációra. A méh vérellátása az ösztrozt megelőző 4 napban a legmagasabb, ezután csökken. A ciklus 10., 11. és 12. napján a legalacsonyabb. A DDAH2 megnövekedett szintjének proösztrozban és csökkent szintjének megállapítása az ösztroz alatt azt sugallta, hogy a DDAH2 részt vehet a koca méh NO-val kapcsolatos értágításában. Ezért lehetséges, hogy a DDAH2 hasznos lehet a sertés kocák ösztrozának azonosításában [40].

Mesterséges intelligencia (AI) alkalmazása

A legújabb sertésenyésztő telepek mesterséges intelligenciát használnak. Ezek a berendezések szenzorokkal és kamerákkal detektálják az ivarzás kezdetét. Steven Verhoeven és munkatársai egy 2023-as cikkben leírták, hogy a mesterséges intelligencián alapuló elektronikus eszközök javíthatják az ellési arányt, az ismételt ellések arányát, az első termékenyítés utáni ellési arányt és az alomszámot. A kamerák rögzítik a sertések mozgását, majd az adatokat tovább küldve a számítógép kielemezi azt, és az adatokat grafikonban rögzíti. A mozgási mintázat alapján a program előre jelzi, hogy melyik időpont a legalkalmasabb az inszeminálásra. Ebben a kísérletben a SmaRt Sow Breeding nevű programot használták. Ez csak a kocák viselkedésének kielemezésére alkalmas, mivel a süldőknek még nincsenek kiforrott viselkedési mintáik. Ez a program a választást követő második napon kielemezi minden egyes koca egyedi viselkedésmintázatát, majd a rögzíti az ivarzásra jellemző viselkedésben történt

változást. Ebből a viselkedésváltozásból számolja ki, hogy melyik napon kell a termékenyítésnek megtörténnie. Ahhoz, hogy ez a program megfelelően tudjon működni a gondozóknak napi egyszer ajánlott a kankontaktust elvégezni, majd rögzíteniük kell a rendszerben, ha ivarzót találtak. Emellett át kell térniük a napi kétszeri etetésre, hogy a program el tudja különíteni az etetés közben végzett mozgást az ivarzás miatt bekövetkezett mozgásminta változástól. Mindemellett az istállóban teljes csendnek kell lennie, hogy ne érje olyan stressz az állatokat, ami a mozgásukban megzavarná őket [41].

Emellett már létezik olyan mesterséges intelligenciára épülő program, amely ultrahanggal méri, hogy a sertés mennyi ideig áll, illetve infravörös kamerával rögzíti a vulva hőmérsékletét, és ezekből az adatokból határozza meg, hogy mikor kell az állatokat inszeminálni. Ji Hwan Lee és munkatársai kísérletéből kiderül, hogy az ivarzás során az állással töltött idő 25-32, de akár 125%-kal is megnőhet. A vulva hőmérséklete mintegy 20%-kal nő meg. Az AI ezekkel az információkkal dolgozik, és ezekből az adatokból határozza meg, hogy a koca mikor alkalmas a termékenyítésre.

A mesterséges intelligencia alkalmazása egy jó megoldás lehet a felesleges stressz kiváltásának megakadályozására, mint amit például a hátalási próba okoz, emellett későbbiekben akár kiválthatjuk az altrenogeszt alkalmazását is [42].

Ezek mellett jelenleg is folyik olyan ivarzást detektáló AI program megírása, amely a vulva méretéből kalkulálja ki az ivarzás idejét [43].

A mesterséges intelligencia bevonása a tenyésztésbe még nem teljesen kiforrott. Az eredmények sok esetben függenek a menedzsmenttől, a sertések genetikájától és az inszemináláshoz használt sperma dózistól [41].

2.3.1.5. Inszeminálási technikák ismertetése, azok előnyei, hátrányai

A mesterséges termékenyítéssel kapcsolatos munka- és termelési hatékonyság drámaian megváltozott a természetes pároztatáshoz képest, amely nőtényenként 22 percet vett igénybe az ivarzás észlelésétől a pároztatás végéig. Napjainkban a modern tenyésztés lehetővé teszi, hogy az ivarzás észlelésére 1-2 perc, a mesterséges megtermékenyítésre pedig 4 perc álljon rendelkezésre.

Mivel egyre több mezőgazdasági cég érte el a magas reprodukciós teljesítményre kitűzött célokat, a prioritások a kevesebb sperma és kevesebb termékenyítés felhasználásával elérhető nagyobb genetikai előrelépés lehetőségei felé változtak. Az e technológia fejlesztését célzó beruházások Európában a 2000-es években kezdődtek a hagyományos mesterséges

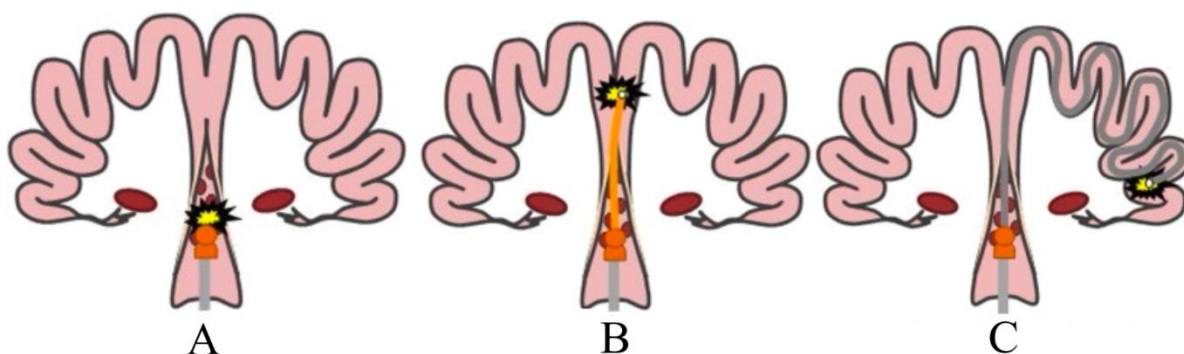
termékenyítéshez használt spermiumok számának fokozatos csökkentésével, ami lehetővé tette a magasabb indexű apák nagyobb mértékű használatát. Ez javította az állattenyésztő telepek gazdasági megtérülését. Az intrauterin mesterséges termékenyítési technika elterjedése egyre inkább növekszik, és egyre több genetikai beszállító állít elő csökkentett spermaszámú AI-dózisokat kisebb mennyiségben és kisebb kiszerezésben.

Az intrauterin AI, vagy más néven postcervicalis inszeminációs technika, nem igényel nagyobb munkaerőt, mint a hagyományos termékenyítés. Ugyanakkor jól kell megválasztanunk az inszemináló katétert, mivel vannak olyan katéter fajták, amelyeket egyes kocák és süldők esetében nehezebb lehet a méhbe juttatni. Ez utóbbi esetben hagyományos AI-t kell elvégezni az adott sertéseken.

Felmerült az a tény, hogy a kanexpozió esetleg negatív hatással lehet az intrauterin termékenyülésre. Mindkét oldalt igazoló cikkek születtek, de a mai napig nem tudják, hogy milyen hatással vannak a kanok az IUAI esetében.

A termékenyítés során a hagyományos termékenyítéshez hasonlóan az intrauterin termékenyítés során is előfordul visszafolyás, ugyanakkor ennek mértéke kevesebb a hagyományos eljáráshoz képest. Visszafolyás akkor fordulhat elő, ha nem megfelelően vagy erőltetve próbálják behelyezni a katétert a nyakcsatornába vagy a méhbe. Emellett a spermát tartalmazó flakon összenyomása esetén is visszafolyás történik, vagyis nem szabad erőltetni a sperma bejuttatását, a nyakcsatorna és a méh szívó hatására kell bízni a sperma felvételét.

A spermiumok számának további csökkentése érdekében kifejlesztették a mély méhen belüli mesterséges termékenyítést (DIUAI). Ehhez még kevesebb spermaszámra van szükség. Míg az intrauterinalis termékenyítésnél a hagyományos termékenyítéshez szükséges sperma adag felére, a mély intrauterinalis termékenyítéshez a hagyományos termékenyítési dózis ötöde is elegendő. Ennél a technikánál a tuba uterina méh felőli bejáratához juttatják a katétert [18] [7]. A DIUAI hátránya, hogy kisebb az alomszám, mint a hagyományos mesterséges termékenyítés esetében, ha nem megfelelő mennyiségű termékenyítő adagot juttatnak be intrauterin. Az efféle csökkent alomszám az unilaterális vagy részben bilaterális termékenyülésnek tudható be. A DIUAI során felléphet annak a kockázata, hogy az uterus az inszemináció során megsérül, illetve hogy fertőzés lép fel a beavatkozás során [44]. A 6. ábra szemlélteti a különböző inszeminálási technikák helyét.



6. ábra: A különböző inszeminálási technikák: A) Cervicalis termékenyítés, B) Intrauterinalis termékenyítés, C) Mély intrauterinalis termékenyítés [44]

A következő táblázatban szeretném összefoglalni e három inszeminálási módszer paramétereit. A táblázat mutatja, hogy az adott termékenyítési eljárásokhoz mennyi spermiumszám szükséges.

1. táblázat: A különböző inszeminálási eljárásokhoz szükséges spermiumszám [7]

	Cervicalis termékenyítés 3×10^9 spermium	Intrauterinalis termékenyítés $1,5 \times 10^9$ spermium	Mély intrauterinális termékenyítés $0,6 \times 10^9$ spermium
Ugratások száma	2/hét	2/hét	2/hét
Termékenyítő anyag/ejakuláció	20	40	100
Termékenyítő adag/év	2000	4000	10000
Szükséges kanok száma	10	5	2

2.3.1.6. A sikeres termékenyítés ellenőrzése

A költséghatékony állattenyésztéshez hozzátartozik, hogy minél hamarabb megbizonyosodjunk arról, hogy sikeres volt a mesterséges termékenyítés, emiatt fontos, hogy mielőbb megtörténjen a vemhesség diagnosztizálása vagy annak kizárása. Fontos, hogy minél hamarabb detektáljuk a nem vemhes egyedeket, annak érdekében, hogy az üresen töltött napok számát és az ebből kiinduló pénzkiesést csökkentsük.

A legtöbb gazdaságban ultrahangos módszerrel diagnosztizálják a vemhességet a termékenyítés utáni 16-20. napon. Ezzel pontosan meg lehet mondani, hogy az inszeminálás sikeres volt vagy sem. Ugyanakkor ez az eljárás szakértelmet igényel, illetve a vizsgálathoz szükséges ultrahang berendezés is költséges. Emiatt több fejlesztő cég is próbál felhasználóbarátabb, olcsóbb és mindemellett pontos eszközöket gyártani, amelyek segíthetik a korai vemhességdiagnosztikát.

Az egyik ilyen megoldás a progeszteron szint detektálására szolgáló tesztek. Ezzel az inszeminálás után 30 nappal ki lehet mutatni a vemhességet. Ugyanakkor ez egy nem megbízható módszer, mivel a progeszteron szintet befolyásolhatja a hőstressz, így a forró nyári napokon fals eredményt kaphatunk a teszt használata során.

2024-ben Sunwoo Park és munkatársai cikkükben publikáltak egy olyan módszert, ami ezeken az akadályokon átívelhet. A porcine early pregnancy factor (pEPF) ellen patkányokban termeltetett monoklonális ellenanyagokkal (mAb) az inszeminálás után 20-30 nappal 70%-os valószínűséggel ki lehet mutatni a vemhességet [45].

Habár a pontosság lehetne jobb is, véleményem szerint egy nagyobb telepnél, ahol nem tudják megoldani az állandó állatorvosi szolgáltatot, ott hasznos lehet ez a teszt, illetve célravezető lenne hasonló elven alapuló tesztek létrehozni.

2.3.2. Embriótranszfer (ET)

Az embriótranszfer manapság már széles körben elterjedt az egész világon. Az állattenyésztésben az ET lehetővé teszi a nagy genetikai értékű embriók átültetését úgy, hogy közben minimálisra csökkentsük a fertőző betegségek átvitelének kockázatát. Emellett a szállítási költséget is nagy mértékben csökkenthetjük, illetve állatjólléti szempontból is kedvezőbb az embriók szállítása, mint a szülőpároké.

A sertésenyésztésben az embriótranszfernek kisebb a jelentősége, mint a szarvasmarhatenyésztésben, ugyanakkor az ET elengedhetetlen eleme a ma már rendkívül fontos biotechnológiai beavatkozásoknak, mint például a klónozás és a génszerkesztés.

2.3.2.1. Milyen problémákba ütközhetünk a sertésembrió-transzfer esetében?

Ahhoz, hogy az embrió átültetés széles körben el tudjon terjedni, arra volt szükség, hogy az embriók kinyerése és átültetése nem-sebészi úton valósuljon meg. Más állatfajokban, mint például a szarvasmarhában ez tette lehetővé, hogy világszerte bevett gyakorlattá váljon az ET, ugyanakkor a sertések sajátos anatómiája megnehezíti az embriók kinyerését és átültetését nem-

sebészi úton. Ezen túlmenően a sertésembriók tárolása során felmerülő nehézségek, valamint az in vivo előállított embriókkal való munka emberi és anyagi követelményei sok kutatót elriasztottak az elmúlt években attól, hogy ezzel a témával foglalkozzanak [14].

Annak ellenére, hogy számos kísérlet történt az embrióátültetés egyszerűbb, kevésbé invazív technikáinak kifejlesztésére, mint például a laparoszkópia, a legtöbb esetben a sebészeti átültetés marad a választott módszer, a bonyolult technikák, a magas költségek és az állatoknak okozott stressz ellenére [46]. A nem-sebészeti vagy endoszkópos transzfer technikák fejlesztése kapcsán fontos tudni, hogy az embriók átültetésének helye a méhben befolyásolja-e a sikeresség arányát. J. Stein-Stefani és W. Holtz megfigyelték és 1999-ben publikálták, hogy nem mindegy, hogy az embrió sertések esetében a méh mely területére ültetik be. Kísérletükben sebészi úton a méhszarv közepébe, a méhszarv caudalis negyedébe és a méhtestbe ültettek blasztocishta stádiumban lévő embriókat. A recipienseket az átültetés után 28 és 34 nappal levágták, és megfigyelték, hogy hány százalékban vemhesültek az állatok. A legmagasabb értéket a méhszarv középső részébe történő átültetés során kapták. Ez az érték 88% volt. Ezt követte a méhszarv caudalis negyedébe történő átültetés, 81%-kal. A legrosszabb értéket a méhtestbe történő átültetés során kapták, ez 12% volt. Az embriók átlagos túlélési aránya a méhszarv közepére történő átültetés után 41% volt, szemben a caudalis negyedbe vagy a méhtestbe történő átültetés utáni 29 és 3%-kal.

Ezekből az adatokból arra következtethetünk, hogy a méhtest nem megfelelő helyül szolgál az embriók átültetésének [47].

A természetes tenyésztés vagy mesterséges termékenyítés (AI) során előállított embriók közel 40%-a nem fejlődik ki a terminusig, mivel e fajban szembetűnő embrióhalandóság fordul elő, főként a periimplantációs időszakban (15-30. nap). Ez az arány sokkal magasabb ET esetében, ahol az átültetett embriók 70%-a elpusztul. Feltételezik, hogy ez a megnövekedett immunaktivitásnak tudható be. A periimplantációs időszakban az anya és az embrió közötti molekuláris kommunikáció felelős az endometrium receptivitásának kialakításáért, valamint a pro- és anti-inflammatorikus jelek közötti egyensúly megteremtéséért. Ilyen molekuláris anyagok például a növekedési faktorok és a citokinek [48].

2.3.2.2. Embriótranszfer kivitelezése sertésekben

Donor sertések kiválasztása és szuperovulációs kezelés

Az embriótranszfer magába foglalja a donor sertések szelekcióját, a kocák stimulálását, a petesejtek kinyerését, megtermékenyítését, az embriók tárolását és kezelését. Ebben az alfejezetben ezen lépésekre szeretnék részletesebben kitérni.

A pubertás előtt álló és a már ciklusba lendült süldők pozitívabb választ adnak a szuperovulációs kezelésekre. Ez azonban nem zárja ki, hogy a már idősebb korban lévő süldők és kocák ne lennének alkalmasak donor állatnak. Idősebb állatokat főleg a genetikai értékük megőrzésére szoktak kiválasztani. A szuperovulációs stimulálásra egyéni válaszreakciót szoktak adni a süldők és a kocák egyaránt, így megjósolhatatlan, hogy az adott stimulusra milyen választ fognak adni. Azt azonban megfigyelték, hogy a fiatalabb sertések stimulusára magasabb válasz szokott érkezni (átlagosan $11,7 \pm 2,5$ alomnagyság) az idősebb kocákhoz képest (3-11 alomnagyság).

A szuperovulációs kezelés eCG-vel (PMSG) és hCG-vel együttesen történik. A pubertás előtt álló süldők először 500 NE hCG-t kapnak, majd 72 óra elteltével átesnek 1000-1500 NE eCG kezelésen. A már ivarzó süldők kezelését szinkronizáció előzi meg, amely során altrenogesztet etetnek 15 napon keresztül a sertésekkel. Ezt követi a szuperovulációs kezelés 500 NE hCG keretében, majd 78 óra elteltével 1500 NE eCG. Többször ellett kocák a választás után 24 órával 1000-1250 NE eCG-t kapnak, majd 58 órával az eCG után 500 NE hCG-t kell nekik beadni [49].

A választás utáni altrenogesztrel történő ivarzás késleltetés köztudottan biztonságosan alkalmazható anélkül, hogy bármilyen káros hatással lenne az ovulációra vagy az embrionális fejlődésre[50]. Ugyanakkor Henar Gonzalez-Ramiro és munkatársai egy 2023-as kutatásban bebizonyították, hogy a választást követő rövid távú altrenogeszt kezelés a szuperovulációs kezeléssel kombinálva negatív hatással van az embrió fejlődésére. Ez a kombinált kezelés befolyásolja az embrió génexpresszióját, amely rontja az embrió metabolikus képességeit, és ezzel a felhasználásra szánt embrió minőségét. Emellett rontja a glutation-anyagszere utvonat szabályozását, így az embrió nem képes megfelelően az oxidatív stressznek ellenállni, amely a későbbiekben rontja az embrió fejlődését. Ezen kutatás alapján tehát célszerű elkerülnünk a szinkronizálás és a szuperovuláltatás kombinált alkalmazását kocák esetében [51].

Embrió kinyerés

Más fajokkal ellentétben a sertések esetében a transzcervikális kimosás nem lehetséges opció az embrió kinyerésére, ugyanis a sertések méhszarva hosszú és tekervényes[52]. Emiatt sertéseknél csak a vágóhídi vagy a sebészeti úton történő kinyerés jöhet szóba. A sebészeti beavatkozást mély alatatásban végzik az ivarzási ciklus 6. napján ventralis laparatómiával. Az uterotubularis junctio-tól 30-40 cm-re bemetszést ejtenek a méhfalba, majd üveg kanülön keresztül fehérjementes mosófolyadékot fecskendeznek be, ezt követően a folyadékot az embriókkal az üveg kanülön keresztül kimasszírozzák a méhből. Ezután a keletkezett sebeket zárják [53].

Embrióbírálat

A későbbi beültetéshez elengedhetetlen az embriók bírálata, osztályokba sorolása. Ehhez Petri-csészére, fénymikroszkópra és szakértelemre van szükség. Négy alkalommal elengedhetetlen az embriók osztályozása:

- Embrió kinyerés után.
- Embriók kultiválása után.
- Mélyhűtésből való felolvasztás után.
- Mikromanipulációs kezelések után.

Ezalatt az embriók átesnek egy morfológiai bírálaton, meghatározzák, hogy az embriók milyen fejlődési stádiumban vannak, illetve egy funkcionális értékelésen is átesnek. Az osztályozást a Nemzetközi Embriótechnológiai Szövetség kézikönyve szerint kell elvégezni, majd ezután négy osztályba lehet sorolni az embriókat. A kategóriák meghatározzák, hogy az embriók alkalmasak-e az átültetésre, azt milyen módon lehet véghez vinni vagy egyáltalán nem alkalmasak. Emellett genetikai vizsgálatnak is alávetetjük az az embriókat biopszia után [7].

A 2. táblázatban összefoglaltam az embrióbírálat szempontjait, illetve, hogy az adott kategóriákba sorolt embriókat mire lehet felhasználni.

2. táblázat: Embrióbírálat szempontjai és az e szerinti felhasználhatóság [7]

Osztály	Fejlődő képesség (%)	Tulajdonságok	Felhasználhatóság
1 (Excellent)	85	szimmetrikus, sejtjeinek mérete, színe, denzitása egységes, zona pellucida gömb alakú, egyenletes felületű, sejtek 85%-a intakt és életképes,	Transzferre, mélyhűtésre, mikromanipulációra
2 (Good)	70	enyhén szabálytalan, egy-két kizáródott sejt, egy-két vesiculum lehetséges, a sejtek 50%-a intakt és életképes	Friss transzferre megfelelő
3 (Fair)	30	több szabálytalanság, kizáródott részletek	Friss beültetésre vizsgálatok sorozata után használható
4 (Poor)	5	Súlyos eltérések, különböző méretű és alakú blasztomerek, több kizáródott sejt, abnormális embrió	Alkalmatlan

Embrió tárolás

Az embriók kriokonzerválása fontos a nagy távolságra történő embrióátültetés és a genetikai erőforrások megőrzése szempontjából. A sertéskutatás fontos az állattenyésztés és az orvosbiológiai kutatás szempontjából. A sertésembriókat azonban nehéz hibernálni a magas citoplazmatikus lipidtartalmuk és a hűtési stresszre való érzékenységük miatt. A vitrifikáció hatékonyabb, mint a lassú fagyasztás, ezért az embriók krioprezerválásánál többnyire a vitrifikációt alkalmazzák. A vitrifikációs technika alkalmazásával a fialási arány javult [54].

Recipiensek kiválasztása

Fontos tudni, hogy pubertás előtt álló süldők is használhatók, ugyanakkor a már ciklusba lendült és a már ellett kocák a kiforrott hormonális szabályzásuk és a méhük fejlettebb állapota

miatt sokkal alkalmasabbak az embriók befogadására. A beültetés előtt a donor sertésekkel szinkronizálják őket is, a már korábban leírt módon, a szuperoovulációt leszámítva. Emellett természetesen a donor sertések is használhatók recipiensként [49].

Embrió átültetés

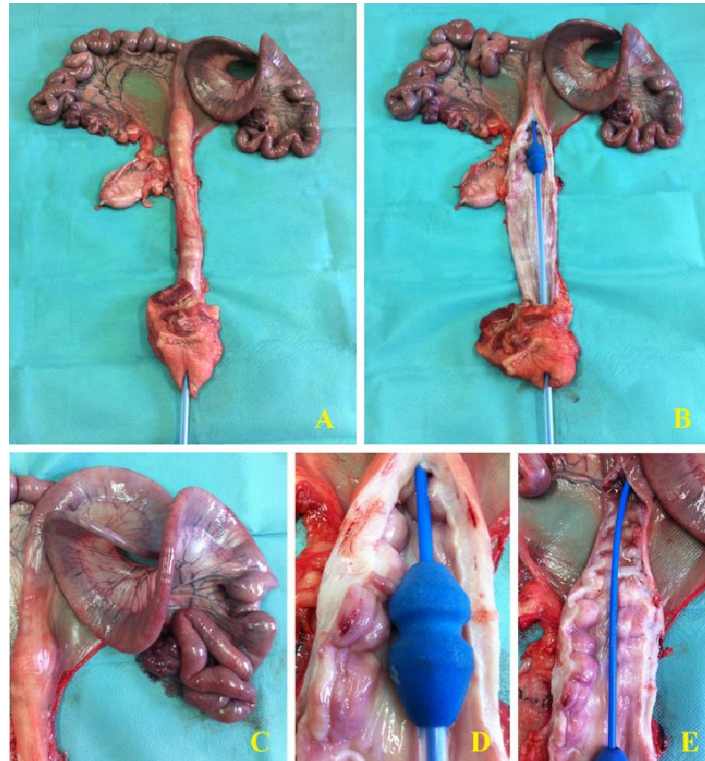
Ahogy már fentebb is említettem, sertések esetében az embriótranszfert sokáig csak műtéti úton voltak képesek véghez vinni, illetve a sertésembriók mélyhűtése is nehézkes volt. Ugyanakkor az elmúlt két évtizedben új eljárást dolgoztak ki ezen akadályok leküzdésére. Ez a non-surgical deep uterine (NsDU) embryo transfer (ET) technológia. Már a 2000-es évek elejétől folytak kísérletek, amelyeket addig fejlesztettek, míg el nem érték, hogy a megszületett alomszám 9, az ellési százalék 90% legyen. Emellett a vitrifikáció jelenleg az egyetlen alkalmas módszer a sertés morulák vagy blasztociszták hosszú távú tárolására, amely ma még az embrió előkezelése nélkül is magas in vitro túlélési időt biztosít a felmelegítés után.

Régebben feltételezték, hogy az ET-k során 20-nál több vitrifikált embrió átültetése nem ad jobb eredményt. Ugyanakkor kísérletek sorozata után Berthelot és munkatársai megállapították, hogy nagyobb számú (30-40) vitrifikált embrió felhasználásával magasabb vemhességi és ellési arányt érhetnek el. Az átültetett embriók számának növelése növeli az életképes magzatok számát a vemhesség 30. napján, és ezt követően az élve született malacok számát is [55].

Ahogy fentebb említettem, az sem mindegy, hogy az ET a méh mely területén történik. Fiziológiásan a ciklus 6. és 7. napján a morulák vagy a blasztociszták a méhtest felé vándorolnak a méhszarv csúcsától. Ugyanakkor kutatások kimutatták, hogy az ET-t érdemes a méhszarv középső részében kivitelezni, mintsem a méhszarv caudalis részébe vagy a méhtestbe [47].

Egy másik kutatásban bebizonyították, hogy a vitrifikált blasztociszták in vitro körülmények között életképesebbek, mint a vitrifikált morulák, ugyanis a blasztociszták vitrifikációval szembeni toleranciája magasabb. Ugyanakkor Emilio A. Martinez és munkatársai által végzett kutatásban nem volt szignifikáns különbség a fialási arányban és az alomszámban a vitrifikált morulák és blasztociszták beültetése során [55].

A 7. ábrán az NSDU-ET-hez használt katétert, illetve annak a méhen belül megfelelően elhelyezett pozícióját lehet látni.



7. ábra: A katéter sziluettje a helyes méhszarvba történő behelyezése után (A, C). Az inszeminációs katéter helyzete a méhnyak bemeneténél (B, D) és az ET-katéter a méhnyak redőin keresztül (E) [56]

2.3.3. In vitro embriótermelés (IVP)

Az elmúlt tíz évben sokat fejlődött az in vitro embriótermelés. Ebben a részben arra szeretnék kitérni, hogy milyen újításokat vezettek be az elmúlt években annak érdekében, hogy az IVP ideálisabban véghezvihető lehessen.

Az in vitro embrió előállítása megkönnyítheti az értékes genetikai anyagok globális cseréjét, felgyorsíthatja a tenyésztési programokat és javíthatja a termelékenységet, valamint alapvető fontosságú a genetikailag módosított (GM) sertések előállításához. Ezzel a technikával egyrészt növelhetjük a hús minőségét, illetve az állatok betegségekkel szembeni ellenállóképességét, másrészt ezek a sertések értékes orvosbiológiai modellként szolgálnak az emberi betegségek kutatásához, a regeneratív orvosláshoz és a szervátültetéshez.

Az embrió megtermékenyítése történhet in vivo. Viszont az in vivo módszerek munkaigényesek, szakképzett személyzetet igényelnek, és sok embriódonorra van szükség a kiváló minőségű eredmények eléréséhez. Ezzel ellentétben az in vitro embriótermelés sokkal jobban ellenőrzött folyamatokon keresztül zajlik le. Ezen folyamatok közé tartozik az in vitro maturation (IVM), az in vitro fertilization (IVF) és az in vitro cultivation (IVC) [57].

Ovum pick-up (OPU)

A kocák nemiszervének anatómiája miatt a transvaginális petesejtkinyerés hatalmas stressz az állatok számára, és ez jóléti aggályokat vet fel. Emiatt e aggály áthidalására szedációt és epidurális érzéstelenítést használnak az eljárás során [58] [59] [60].

A laparoszkóppal gyűjtött petesejtek magasabb fejlődési kompetenciát mutattak, mint a levágott állatokból gyűjtött petesejtek. A laparoszkóppal nyert oociták szignifikánsan nagyobb megtermékenyítési arányt, hasadási arányt, blasztocisza képződési arányt és általános blasztocisza-minőséget mutattak a tenyésztés végén.

Ezek az előre lépések jelentősen felgyorsíthatják a sertésitenyésztés genetikai javítási programjait az IVP embriók felhasználásával [61].

Polispermia előfordulásának csökkentésére irányuló kutatások

A polispermia két okból jelent nagy problémát, az egyik, hogy az életképes embriók számának csökkenése révén rontja az IVP hatékonyságát a másik ok, hogy az így született értékek pontatlan eredményekhez vezetnek, mivel a polisperm zigóták olyan spermiumokká fejlődnek, amik ránézésre megkülönböztethetetlenek a normál spermiumoktól [62].

A polispermia előfordulásának csökkentésére Martinez és munkatársai kifejlesztettek egy módszert. Egy olyan spermafagyasztási eljárást találtak, mely nem okoz nagy mértékű polispermiát. Az eljárás azon alapult, hogy alacsony sperma koncentrációban (20×10^6 sperma/ml) fagyasztották le a spermát a kontrollcsoportéhoz (1000×10^6 sperma/ml) képest. A felolvasztás után a két csoport között nem volt jelentős mozgásbeli különbség, ellenben az ép akroszómával rendelkező spermiumok aránya szignifikánsan magasabb volt, ebben a csoportban a penetráció is jobb volt. Emellett azt is megfigyelték, hogy az alacsony koncentrációban fagyasztott sperma esetében, ha együtt inkubálták az oocytákkal, akkor magasabb volt a monospermiát mutatók aránya, az IVF hatékonyabb volt, és magasabb arányban képződtek ép blasztocyszták. Ebből a kísérletből arra következtethetünk, hogy a nagyobb hígítással történt mélyfagyasztás csökkenti a polispermia előfordulását [63].

Természetes folyadékok használata a tenyész közegben

Egyes adatok arra utalnak, hogy az asszisztált reprodukciós technikák (ART) alkalmazása által megzavart epigenetikai génszabályozás hozzájárulhat a kedvezőtlen kimenetelhez. Egyre több bizonyíték utal arra, hogy az embrió érzékeny a nagyon korai környezetére, és hogy az ART során használt táptalajok hosszú távú következményekkel

járhatnak[64]. Canovas és munkatársai kutatásukban IVP-t hajtottak végre természetes folyadékkal, illetve anélkül (kontroll csoport). Annál a csoportnál, amelynél természetes folyadékokat alkalmaztak, az embriók a sejtszám és a keltetési képesség tekintetében jobb minőségűek voltak, kevesebb volt az aberrációval rendelkező embrió. A kontroll csoport esetében metilációs elemzések több eltérést mutattak, mint a természetes folyadékot alkalmazott csoportban. A kontroll csoport esetében az IGF2R és az NNAT gének nagyobb arányban voltak metilálva, mint a természetes folyadékot használt csoportban. Ezek a gének kritikusak lehetnek az embrió fejlődésének szempontjából.

Ebből arra következtethetünk, hogy IVP alkalmazása során célszerű természetes folyadékokat alkalmaznunk [65].

Kémiaiailag meghatározott médiumok, citokinek hozzáadása a tenyész közeghez

Annak érdekében, hogy pontos protokollokat tudjunk véghez vinni IVP során, fontos, hogy meghatározott tenyész közeggel dolgozzunk. Ezek valójában alapoldatok, de az összetevőik pontosan meg vannak határozva[66]. Voltak kísérletek azzal kapcsolatban, hogy az egyes citokinek (specifically granulocyte macrophage-colony stimulating factor (GM-CSF), macrophage-colony stimulating factor (M-CSF), and granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) hozzáadása a tenyész közeghez, hogyan hatnak az IVP során. Egyes kutatók azt találták, hogy nincs hatása a fejlődésre, de egy bizonyos koncentráció (10 ng/ml) jelentősen növelte a megtermékenyített embriókban a blasztociszták képződését. Bár ezek az eredmények ígéretesek voltak, ezt nem kutatták tovább [67].

A legújabb kutatások az IL-6 család tagjaira, azon belül is főleg az IL-6-ra és a leukémiát gátló növekedési faktorra (LIF) összpontosulnak. Az tápközeg IL-6-tal való kiegészítése jelentősen növelte a sertés embriók fejlődését, minőségét és génexpressziós profilját [68]. Ugyanakkor a magas IL-6 koncentráció negatívan hat a blasztociszta fejlődésére. Ebből arra következtethetünk, hogy a jótékony citokin mennyiség dóziszfüggő.[69] Emellett az sem mindegy, hogy mikor adják hozzá a táptalajhoz a citokineket. Azt figyelték meg, hogy a tenyésztés végén hozzáadott IL-6 citokinek jótékony hatásúak voltak, de ha folyamatosan adagolták a citokineket a táptalajba, azzal negatív hatást váltottak ki [70].

Ezekből a kutatásokból arra következtethetünk, hogy a tápközeghez megfelelő koncentrációban, megfelelő időben hozzáadott citokinek jótékony hatással lehetnek az embrió fejlődésére, és ezek hozzáadásával optimalizálhatóvá válik az IVP. Érdekes ezzel kapcsolatban további kutatásokat folytatni, ugyanis még több citokin embrióra gyakorolt hatását nem tesztelték haszonállatokon tápfolyadékhoz hozzáadva.

2.3.4. Genetikailag módosított sertések előállítása, génszerkesztés (GE)

Míg korábban, az 1920-a évek óta, csak fenotípus alapján szelektáltak, ma már a molekuláris biológia tudománya olyan szintre fejlődött, hogy az emberek számára elérhetővé vált a genomikai szelekció, illetve a génszerkesztésnek köszönhetően célzottan vihetünk be különböző tulajdonságokat a sertésekbe [71] [72].

Több genomszerkesztési technológia áll rendelkezésünkre (cink-ujj nukleázok (ZFN), transcription activator-like effector nuclease (TALEN), CRISPR-associated (Cas) endoribonuclease 9 (Cas9)). Ezek közül a CRISPR/Cas9 módszer vált meghatározóvá, mivel nincs nagy technológiai akadálya a használatának, illetve nagy hatékonysággal lehet alkalmazni [73].

Az utóbbi években több gén szerkesztésével is próbálkoztak kutatók több-kevesebb sikerrel. Ezekből kiemelnék egynéhányat, melyek véleményem szerint a jövőben hozzájárulhatnak a sertésipar fejlődéséhez.

Miosztatin (MSTN) gén kiütése

A miosztatin közvetlenül gátolja az izomfehérje szintézist, serkenti az izomfehérje lebomlását, és antagonizálja az inzulinszerű növekedési faktor (IGF)1 hatását, amely az izomnövekedésért felelne.[74] Az MSTN gén mutációi izomhipertrofiához vagy kettős izomzatú (double muscle, DM) fenotípushoz vezethetnek szarvasmarhában, juhban, kutyában és emberben. Sertésekben azonban nem számoltak be jelentős izom fenotípusról az MSTN mutációkkal összefüggésben. Az első sikeres MSTN KO sertést Meishan fajtában érték el ZFN technológiával Qian és munkatársai. Az MSTN-mutáns sertések normálisan fejlődtek és növekedtek, izomtömegük megnövekedett a vad típusú sertésekhez képest. Csökkent zsírfelhalmozódás mellett, a homozigóta MSTN-mutáns (MSTN^{-/-}) sertések pedig nyolc hónapos korukban nyilvánvaló DM-fenotípust mutattak, és az egyéni izomtömegük 100%-kal nőtt a vad típusú kontrollhoz (MSTN^{+/+}) képest a myofiber hyperplasia következtében. [75] A kezdeti sikerek ellenére ezt a hatást nem tudták elérni kereskedelmi fajták (pl. Landrace, Nagy fehér, Duroc) esetében, sőt gyakran egészségügyi problémákkal szembesültek, és röviddel a születés után elpusztultak ezek az állatok. Ennek elsődleges oka az lehet, hogy MSTN szabályozza a kollagén expresszióját és proliferációját az ín és a linea alba fibroblasztokban; így az MSTN hiánya kollagénnel összefüggő patológiás tüneteket okoz MSTN^{-/-} sertésekben [76] [77].

Barna zsírszövet, uncoupling protein 1 (UPC 1) gén

A malacokból hiányzik az a gén, amely a barna zsírszövetet kódolja. Ez a zsír egy speciális típusa, mely biztosítani tudná a malacoknak a hőtermelést, és így a hőszabályzásuk fő mechanizmusa nem csak a reszketésre épülne. Ez a gén körülbelül 20 millió évvel ezelőtt módosulhatott, ekkor a gén 3-5. exonja eshetett ki, legalábbis a humán genommal való összehasonlítás után ezt feltételezik a kutatók. Mivel a sertéseknek gyenge a termoregulációjuk, ezért magas hőmérsékletet kell biztosítanunk a számukra, annak érdekében, hogy termoneutrális zónában tartsuk őket [78].

Zhang és munkatársai képesek voltak egér adiponektin-UCP1 gént CRISPR/Cas9 technológiával a sertés endogén UPC-1 lókuszába helyezni. Az így kapott UCP1 knock-in (KI) sertések képesek voltak testhőt fenntartani akut hideg expozíció során, de nem változott a fizikai aktivitásuk vagy a teljes napi energiaszükségletük. Az UCP1 KI malacok 4 órás 4°C-os hidegexpozíció során 38°C-os normál rektális hőmérsékletet tudtak fenntartani, míg a kontrollcsoportban hipotermia alakult ki. A carcass értékelése továbbá azt mutatta, hogy a hátszalonna vastagsága, az adipociták mérete és a testzsír felhalmozódása jelentősen csökkent. A KI sertéseknek kevesebb volt a fehér zsírszövetük, ami növeli az állatok jólétét. Mivel ezek a malacok nem igényelnek magas külső hőmérsékletet, ezért a termoneutrális zóna fenntartásához szükséges gazdasági károkat is lehetne az ilyen malacokkal csökkenteni [79].

Alpha gal szindróma (AGS) kivédése

Az alpha gal szindróma a galaktóz-alfa-1,3-galaktózra adott IgE mediált túlérzékenység, melyet a kullancsok csípése tud okozni. Ezt a betegséget 15 éve írták le, és egyre nagyobb a jelentősége. Galaktóz-alfa-1,3-galaktóz szinte minden emlősfajban, (leszámítva az embert és néhány főemlőst) jelenlevő cukormolekula. Emiatt a vörös húsok (sertés-, marha- és birkahús) fogyasztása allergiát válthat ki az izomsejtek felszínén lévő alfa-Gal jelenléte miatt [80] [81]. Ennek hatására az USA-ban az FDA már engedélyezte a „GalSafe” sertések tenyésztését [82]. Ez abból áll, hogy CRISPR/Cas9 génszerkesztéssel alfa-gal KO sertéseket hoznak létre, amelyekből az allergiát okozó antigén már hiányzik, így biztonságosan fogyaszthatók az arra érzékenyek számára is [83].

Ellenálló sertések létrehozása

A vírusok a sejtek felületén lévő különféle receptorokhoz képesek kötődni, majd ezáltal bejutni a célsejtekbe. Ha képesek lennénk a kötődomént génszerkesztéssel módosítani, akkor képesek lehetünk a fertőzést megakadályozni. Eddig a következő vírusok ellen próbálkoztak génszerkesztéssel fellépni több-kevesebb sikerrel:

- Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV)
- Afrikai sertéspestis (ASFV)
- Porcine epidemic diarrhea virus (PEDV)
- Pransmissibilis gastroenteritis virus (TGEV)
- Klasszikus sertéspestis vírus (CSFV) [84]

2.3.5. Genetikailag módosított sertések a humán gyógyászatban

Az utóbbi években kiterjedt kutatásokat folytattak annak érdekében, hogy a jövőben bevett gyakorlattá váljon, hogy állati szerveket, szöveteket ültessünk emberekbe. Ezt a folyamatot xenotranszplantációnak nevezzük. Az emberrel megegyező szervméretek és egyéb anatómiai és élettani hasonlóságok miatt a sertések a legkedveltebb szervdonor fajok. A xenotranszplantáció sikerének legnagyobb akadálya a gazdaszervezet immunválasza miatti szervkilöködés és a fajok közötti lehetséges fertőző kórokozók átvitele. A különféle génmódosítási kísérletekkel ezen betegségeket szeretnék áthidalni [85].

A xenograftok kilöködésének 4 fő oka lehet:

- Az α -galaktóz oldalláncok okozta szervkilöködés az anasztomózisok megnyitása után. Ekkor egy hiperakut kilöködés zajlik le.
- Antikoagulációs faktorok eltűnése miatti késleltetett szervkilöködés.
- VCAM (vascular cell adhesion molecules) fokozott képződése miatti késő szervkilöködés
- T-sejtes kilöködés

Ezek közül a hiperakut kilöködés okozza a legnagyobb problémát, a többit immunuszuppresszióval lehet kezelni [7].

2023-ban Moazami és munkatársai sikeresen ültettek át sertés szívet két agyhalott emberbe. Az átültetés során nem történt sejtszintű vagy antitest közvetített kilöködés, illetve

fertőzés átvitele sem. Ezek az eredmények azt mutatják, hogy a sertésből emberbe történő szív xenotranszplantáció sikeresen elvégezhető hiperakut kilökődés vagy zoonózis nélkül [86].

2021-ben génmódosított sertések segítségével vesetranszplantációkat hajtottak véget. A műtéthez α -Gal knock-out sertések veséjét használták fel agyhalott betegeken az USA-ban. A xenograftok túlélése 54 és 74 óra volt [87].

Ezekből az eredményekből is látható, hogy érdemes a xenotranszplantációval foglalkozni, hiszen, ha a technológia eljut arra szintre, hogy akadály nélkül tudjuk majd alkalmazni, akkor több ezer szervátültetésre váró személy életét meg tudnánk menteni.

3. Összefoglalás

Az asszisztált reprodukciós technikák a sertésenyésztés modern eszközei, amelyek jelentős szerepet játszanak a genetikai fejlődés, a termelési hatékonyság és a fajtafenntartás területén. A dolgozat célja, hogy bemutassa e technikák típusait, előnyeit és kihívásait.

A legelterjedtebb asszisztált reprodukciós módszerek közé tartozik a mesterséges termékenyítés. Ezt a technológiát már több évtizede alkalmazzák a sertésenyésztésben, azonban a folyamatos fejlesztéseknek hála, jelentősen tudják napjainkban fokozni a tenyésztés eredményességét. Munkaerőhiányból adódó problémák hatékony megoldását jelentené automata spermagyűjtő és mesterséges intelligencián alapuló ivarzásdetektáló berendezések alkalmazása, valamint rendszeresítése, még annak ellenére is, hogy jelentős anyagi beruházást igényelne. Fontos megemlítenem az ivarsejtek kezelésében a sperma 5°C-on történő tárolását, mely széles körben alkalmazva jelentősen csökkenthetné a felhasznált antibiotikum mennyiségét és ezáltal az antibiotikum rezisztencia terjedése is közvetve mérséklődne.

Habár az *in vitro* termelés és az embriótranszfer a sertések esetében még csak gyerekcipőben jár a többi állatfajhoz képest, úgy fest, hogy az elmúlt évtized kutatásainak köszönhetően nagyobb figyelmet fognak fordítani ezen technológiák továbbfejlesztésére, hiszen ezen eljárások előfeltételei a génszerkesztésnek. A különféle génszerkesztési eljárások jelenleg a legkutatottabb módszerek közé tartoznak. Ez nem is annyira meglepő, hiszen ezzel a technikával az emberek képesek lehetnek javítani az állatok termelési képességeit (lásd: miosztatin gén kiütése a genomból, UPC1 gén beépítése a genomba), ellenállóságát a különféle betegségekkel (PRRSV, ASFV, PEDV, TGEV, CSFV) szemben. A génszerkesztés révén csökkenthető a takarmányfelhasználás, amely hozzájárul a fenntarthatóbb állattenyésztési gyakorlatokhoz és a kedvezőbb környezeti hatásokhoz.

E technikák használata nemcsak a gazdasági hatékonyságot növeli, hanem a sertésfajták genetikai diverzitását is segít fenntartani, emellett a humán medicinában is képesek lehetünk a későbbiekben a génszerkesztéssel előállított sertések szöveteit és szerveit felhasználni.

4. Köszönetnyilvánítás

Köszönetemet szeretném kifejezni mindazoknak, akik támogatásukkal hozzájárultak szakdolgozatom elkészítéséhez. Elsősorban hálás vagyok témavezetőmnek, Dr. Horváth Andrásnak, aki lehetőséget biztosított a szakdolgozatom elkészítéséhez, illetve szakmai tanácsaival, észrevételeivel és szakértelmével segítette a munkámat.

Köszönöm családomnak és Dr. Sárkány Mártonnak, akik mindig támogattak és bátorítottak a nehéz pillanatokban, valamint barátaimnak, akik biztatásukkal és jókedvükkel könnyebbé tették a szakdolgozat írását.

5. Irodalomjegyzék

1. (2019) World population prospects 2019: highlights. United Nations, New York
2. Delgado CL (2003) Rising Consumption of Meat and Milk in Developing Countries Has Created a New Food Revolution. The Journal of Nutrition 133:3907S-3910S. <https://doi.org/10.1093/jn/133.11.3907S>
3. Davis TC, White RR (2020) Breeding animals to feed people: The many roles of animal reproduction in ensuring global food security. Theriogenology 150:27–33. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2020.01.041>
4. Garcia A (2007) CHAPTER 112 - Assisted Reproductive Technologies in Swine. In: Youngquist RS, Threlfall WR (eds) Current Therapy in Large Animal Theriogenology (Second Edition). W.B. Saunders, Saint Louis, pp 826–841
5. Bozzini G, Seveso M, Bono P, Francesco OD, Mandressi A, Taverna G (2016) FRII-03 LAZZARO SPALLANZANI (1729-1799): THE FIRST SUCCESSFUL ARTIFICIAL INSEMINATION EXPERIMENTS. Journal of Urology. <https://doi.org/10.1016/j.juro.2016.02.2924>
6. animal breeding: selected articles from the WORLD ANIMAL REVIEW. <https://www.fao.org/4/x6500e/x6500e03.htm>. Accessed 4 Sep 2024
7. Solti L, Bajcsy C, Brüssow K-P, Cseh S, Fodor L, Müller L, Novotni Dankó G, Rátky J, Vincze B (2022) A házi emlősállatok szaporodása (Reproduction of domestic mammals)
8. Zöldág L, Gáspárdy A, Maróti-Agóts Á, Seregi J (2018) Állatorvosi genetika és állattenyésztés, 2018th ed. Állatorvostudományi Egyetem, Budapest
9. Hughes PE, Philip G, Siswadi R (1997) The effects of contact frequency and transport on the efficacy of the boar effect. Animal Reproduction Science 46:159–165. [https://doi.org/10.1016/S0378-4320\(96\)01594-1](https://doi.org/10.1016/S0378-4320(96)01594-1)
10. Andrásófszky E, Dr. Bersényi A, Habil. Prof. Dr. Cenkvari É, Prof. Dr. Fekete SG, Habil. Prof. Dr. Fébel H, Habil. Prof. Dr. Hullár I, Prof. Dr. Szabó JZ (2009) Állatorvosi takarmányozás és dietetika II. átdolgozott kiadás, 2009th ed. Szent István Egyetem Állatorvos-tudományi Kar Budapest, Budapest
11. Hua L, Zhao L, Mao Z, Li W, Li J, Jiang X, Che L, Xu S, Lin Y, Fang Z, Feng B, Wu D, Zhuo Y (2021) Beneficial effects of a decreased meal frequency on nutrient utilization, secretion of luteinizing hormones and ovarian follicular development in gilts. Journal of Animal Science and Biotechnology 12:41. <https://doi.org/10.1186/s40104-021-00564-4>
12. Soede NM, Langendijk P, Kemp B (2011) Reproductive cycles in pigs. Animal Reproduction Science 124:251–258. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2011.02.025>

13. Romar R, Funahashi H, Coy P (2016) *In vitro* fertilization in pigs: New molecules and protocols to consider in the forthcoming years. *Theriogenology* 85:125–134. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2015.07.017>
14. Martinez EA, Martinez CA, Cambra JM, Maside C, Lucas X, Vazquez JL, Vazquez JM, Roca J, Rodriguez-Martinez H, Gil MA, Parrilla I, Cuello C (2019) Achievements and future perspectives of embryo transfer technology in pigs. *Reproduction in Domestic Animals* 54:4–13. <https://doi.org/10.1111/rda.13465>
15. Yeste M, Estrada E, Pinart E, Bonet S, Miró J, Rodríguez-Gil JE (2014) The improving effect of reduced glutathione on boar sperm cryotolerance is related with the intrinsic ejaculate freezability. *Cryobiology* 68:251–261. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2014.02.004>
16. Iwanoff E De la fécondation artificielle chez les mammifères. (No Title)
17. Waberski D, Riesenbeck A, Schulze M, Weitze KF, Johnson L (2019) Application of preserved boar semen for artificial insemination: Past, present and future challenges. *Theriogenology* 137:2–7. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2019.05.030>
18. Knox RV (2016) Artificial insemination in pigs today. *Theriogenology* 85:83–93. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2015.07.009>
19. King GJ, Macpherson JW (1973) A Comparison of Two Methods for Boar Semen Collection. *Journal of Animal Science* 36:563–565. <https://doi.org/10.2527/jas1973.363563x>
20. Terlouw S, Simmet C, Schlingens T, Schenk J, James E, Gunderson G, Didion B, Dobrinsky J (2008) Comparison of AutoMate® and the gloved-hand method for boar semen collection. *Theriogenology* 70:1388–1389. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2008.06.047>
21. Chen Y-H, Yu J-F, Chang Y-J, Chin S-C, Wang L-C, Lin H-L, Tsai P-S (2020) Novel Low-Voltage Electro-Ejaculation Approach for Sperm Collection from Zoo Captive Lanyu Miniature Pigs (*Sus barbatus sumatranus*). *Animals* 10:1825. <https://doi.org/10.3390/ani10101825>
22. (2017) Safemate Artificial Vagina | GenePro, Inc. <https://www.genepro-inc.com/product/coll-02-03/>. Accessed 17 Sep 2024
23. (2020) Safemate Collection System & Supplies | GenePro, Inc. <https://www.genepro-inc.com/product/safemate-collection-system/>. Accessed 17 Sep 2024
24. Collection. <https://danbred-manual.com/nl/handboek-beren-op-het-bedrijf-engelse-versie/collection/>. Accessed 17 Sep 2024
25. Electro ejaculator | Minitube. <https://www.minitube.com/catalog/en/electro-ejaculator-p1054/>. Accessed 5 Nov 2024

26. Balogun KB, Stewart KR (2021) Effects of air exposure and agitation on quality of stored boar semen samples. *Reproduction in Domestic Animals* 56:1200–1208. <https://doi.org/10.1111/rda.13975>
27. Čerovský J, Frydrychová S, Lustýková A, Rozkot M (2005) Changes in boar semen with a high and low level of morphologically abnormal spermatozoa. *Czech J Anim Sci* 50:289–299. <https://doi.org/10.17221/4170-CJAS>
28. Boe-Hansen GB, Satake N (2019) An update on boar semen assessments by flow cytometry and CASA. *Theriogenology* 137:93–103. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2019.05.043>
29. Kuster CE, Althouse GC (2016) The impact of bacteriospermia on boar sperm storage and reproductive performance. *Theriogenology* 85:21–26. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2015.09.049>
30. Manjarín R, Kirkwood RN, Ngula J, Martinez-Pastor F, Alegre B, Domínguez JC (2019) Effect of Oxytocin, Cloprostenol or Buserelin in Semen Doses on Sow Fertility. *Animals* 9:746. <https://doi.org/10.3390/ani9100746>
31. Felhatalmazáson alapuló rendelet - 2023/647 - HU - EUR-Lex. https://eur-lex.europa.eu/eli/reg_del/2023/647/oj?eliuri=eli%3Areg_del%3A2023%3A647%3Aoj&locale=hu. Accessed 18 Sep 2024
32. Waberski D, Luther A-M (2024) Boar semen storage at 5 °C for the reduction of antibiotic use in pig insemination: Pathways from science into practice. *Animal Reproduction Science* 107486. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2024.107486>
33. Maaßen IK, Luther A-M, Verspohl J, Waberski D (2023) Storage of Extended Boar Semen at 5 °C Inhibits Growth of Multi-Drug Resistant *Serratia marcescens* and *Klebsiella oxytoca* while Maintaining High Sperm Quality. *Antibiotics* 12:857. <https://doi.org/10.3390/antibiotics12050857>
34. Larsson K (1978) Deep-freezing of boar semen. *Cryobiology* 15:352–354. [https://doi.org/10.1016/0011-2240\(78\)90048-2](https://doi.org/10.1016/0011-2240(78)90048-2)
35. Foxcroft G, Patterson J, Dyck M IMPROVING PRODUCTION EFFICIENCY IN A COMPETITIVE INDUSTRY
36. Kraeling RR, Webel SK (2015) Current strategies for reproductive management of gilts and sows in North America. *Journal of Animal Science and Biotechnology* 6:3. <https://doi.org/10.1186/2049-1891-6-3>
37. Zhao Q, Tao C, Pan J, Wei Q, Zhu Z, Wang L, Liu M, Huang J, Yu F, Chen X, Zhang L, Li J (2021) Equine chorionic gonadotropin pretreatment 15 days before fixed-time artificial

- insemination improves the reproductive performance of replacement gilts. *Animal* 15:100406. <https://doi.org/10.1016/j.animal.2021.100406>
38. Soede NM, Kemp B (1997) Expression of oestrus and timing of ovulation in pigs. *J Reprod Fertil Suppl* 52:91–103
 39. Rekwot PI, Ogwu D, Oyedipe EO, Sekoni VO (2001) The role of pheromones and biostimulation in animal reproduction. *Animal Reproduction Science* 65:157–170. [https://doi.org/10.1016/S0378-4320\(00\)00223-2](https://doi.org/10.1016/S0378-4320(00)00223-2)
 40. Lee W, Chai S, Lee K, Park H, Kim J, Kim B, Kim N, Jeon H, Kim I, Choi H, Song H (2013) Identification of the DDAH2 Protein in Pig Reproductive Tract Mucus: A Putative Oestrus Detection Marker. *Reproduction in Domestic Animals* 48:e13–e16. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2012.02122.x>
 41. Verhoeven S, Chantziaras I, Bernaerdt E, Loicq M, Verhoeven L, Maes D (2023) The evaluation of an artificial intelligence system for estrus detection in sows. *Porcine Health Management* 9:9. <https://doi.org/10.1186/s40813-023-00303-3>
 42. Lee JH, Lee DH, Yun W, Oh HJ, An JS, Kim YG, Kim GM, Cho JH (2019) Quantifiable and feasible estrus detection using the ultrasonic sensor array and digital infrared thermography. *Journal of Animal Science and Technology* 61:163–169. <https://doi.org/10.5187/jast.2019.61.3.163>
 43. Chang S-C, Wu X-R, Kuan H-Y, Peng S-Y, Chang C-Y (2024) Using deep learning to accurately detect sow vulva size in a group pen with a single camera. *Journal of Animal Science* 102:skad407. <https://doi.org/10.1093/jas/skad407>
 44. Mozo-Martín R, Gil L, Gómez-Rincón CF, Dahmani Y, García-Tomás M, Úbeda JL, Grandía J (2012) Use of a novel double uterine deposition artificial insemination technique using low concentrations of sperm in pigs. *The Veterinary Journal* 193:251–256. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2011.11.007>
 45. Park S, Cho E-S, Kim C-H, Lee S, Jeong Y-D, Park M, Kim D, Seo D, Kim Y-H, Hochi S, Choi I, Chung H-J (2024) Detection of sow pregnancy in day-20 urine samples using monoclonal antibody against synthesized porcine early pregnancy factor: Preliminary results. *Theriogenology* 229:23–29. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2024.08.004>
 46. Strohmeyer A, Strohmeyer C, Reischl J, Wallenhorst S, Holtz W (2023) Is the corpus uteri a suitable site for embryo transfer in the pig? *Theriogenology* 212:37–40. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2023.08.006>
 47. Wallenhorst S, Holtz W (1999) Transfer of pig embryos to different uterine sites. *Journal of Animal Science* 77:2327–2329. <https://doi.org/10.2527/1999.7792327x>

48. Martinez CA, Rubér M, Rodriguez-Martinez H, Alvarez-Rodriguez M (2020) Pig Pregnancies after Transfer of Allogeneic Embryos Show a Dysregulated Endometrial/Placental Cytokine Balance: A Novel Clue for Embryo Death? *Biomolecules* 10:554. <https://doi.org/10.3390/biom10040554>
49. Brüssow K-P, Torner H, Kanitz W, Rátky J (2000) In vitro technologies related to pig embryo transfer. *Reprod Nutr Dev* 40:469–480. <https://doi.org/10.1051/rnd:2000111>
50. Patterson J, Wellen A, Hahn M, Pasternak A, Lowe J, DeHaas S, Kraus D, Williams N, Foxcroft G (2008) Responses to delayed estrus after weaning in sows using oral progestagen treatment1. *Journal of Animal Science* 86:1996–2004. <https://doi.org/10.2527/jas.2007-0440>
51. Gonzalez-Ramiro H, Gil MA, Cuello C, Cambra JM, Gonzalez-Plaza A, Vazquez JM, Vazquez JL, Rodriguez-Martinez H, Lucas-Sanchez A, Parrilla I, Martinez CA, Martinez EA (2023) The Use of a Brief Synchronization Treatment after Weaning, Combined with Superovulation, Has Moderate Effects on the Gene Expression of Surviving Pig Blastocysts. *Animals* 13:1568. <https://doi.org/10.3390/ani13091568>
52. Martinez EA, Vazquez JM, Roca J, Lucas X, Gil MA, Vazquez JL (2001) Deep intrauterine insemination and embryo transfer in pigs. *Reproduction (Cambridge, England) Supplement* 58:301–311
53. Martinez CA, Nohalez A, Parrilla I, Vazquez JL, Roca J, Cuello C, Rodriguez-Martinez H, Martinez EA, Gil MA (2017) Surgical embryo collection but not nonsurgical embryo transfer compromises postintervention prolificacy in sows. *Theriogenology* 87:316–320. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.09.009>
54. Xingzhu D, Qingrui Z, Keren C, Yuxi L, Yunpeng H, Shien Z, Xiangwei F (2021) Cryopreservation of Porcine Embryos: Recent Updates and Progress. *Biopreservation and Biobanking* 19:210–218. <https://doi.org/10.1089/bio.2020.0074>
55. Martinez EA, Martinez CA, Nohalez A, Sanchez-Osorio J, Vazquez JM, Roca J, Parrilla I, Gil MA, Cuello C (2015) Nonsurgical deep uterine transfer of vitrified, in vivo-derived, porcine embryos is as effective as the default surgical approach. *Sci Rep* 5:10587. <https://doi.org/10.1038/srep10587>
56. Martinez E, Cuello C, Parrilla I, Rodriguez-Martinez H, Roca J, Vazquez J, Vazquez J, Gil M (2013) Design, development, and application of a non-surgical deep uterine embryo transfer technique in pigs. *Animal Frontiers* 3:40–47. <https://doi.org/10.2527/af.2013-0032>
57. Garcia-Canovas M, Parrilla I, Cuello C, Gil MA, Martinez EA (2024) Swine in vitro embryo production: Potential, challenges, and advances. *Animal Reproduction Science* 270:107600. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2024.107600>

58. Oltedal A, Björkman S, Peltoniemi O, Gaustad AH, Oropeza-Moe M (2024) Transvaginal Ovum Pick-Up in sows: Impacts on welfare and reproduction. *Theriogenology* 226:68–75. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2024.05.009>
59. Ferguson E, Bellows S, Lemieux F, Godke R (2013) Development of a Chute to Facilitate Transvaginal Ultrasound Guided Oocyte Aspiration (TUGA) in the Sow. *Journal of Veterinary Medical Science* 75:191–194. <https://doi.org/10.1292/jvms.12-0082>
60. Yoshioka K, Uchikura K, Suda T, Matoba S (2020) Production of piglets from *in vitro*-produced blastocysts by ultrasound-guided ovum pick-up from live donors. *Theriogenology* 141:113–119. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2019.09.019>
61. Baldassarre H, Gutierrez K, Glanzner WG, de Macedo MP, Currin L, Guay V, Herrera MEC, Da Silva Z, Fortin F, Bordignon V (2024) Laparoscopic ovum-pick up and in vitro embryo production in gonadotropin-stimulated gilts: Preliminary results and envisioned applications. *Theriogenology* 214:141–147. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2023.10.017>
62. Pronuclear Location Before the First Cell Division Determines Ploidy of Polyspermic Pig Embryos | *Biology of Reproduction* | Oxford Academic. <https://academic.oup.com/biolreprod/article-abstract/61/5/1340/2734639?redirectedFrom=fulltext>. Accessed 19 Oct 2024
63. Martinez CA, Cambra JM, Maside C, Cuello C, Roca J, Martinez EA, Parrilla I, Gil MA (2019) High pre-freezing sperm dilution improves monospermy without affecting the penetration rate in porcine IVF. *Theriogenology* 131:162–168. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2019.04.001>
64. Differences in gene expression profiles between human preimplantation embryos cultured in two different IVF culture media† | *Human Reproduction* | Oxford Academic. <https://academic.oup.com/humrep/article/30/10/2303/675318?login=false>. Accessed 19 Oct 2024
65. Canovas S, Ivanova E, Romar R, García-Martínez S, Soriano-Úbeda C, García-Vázquez FA, Saadeh H, Andrews S, Kelsey G, Coy P (2017) DNA methylation and gene expression changes derived from assisted reproductive technologies can be decreased by reproductive fluids. *eLife* 6:e23670. <https://doi.org/10.7554/eLife.23670>
66. Challenges and Considerations during In Vitro Production of Porcine Embryos. <https://www.mdpi.com/2073-4409/10/10/2770>. Accessed 20 Oct 2024
67. Cai L, Jeong Y, Jin Y, Lee J, Jeong Y, Hwang K, Hyun S, Hwang W (2020) Effects of human recombinant granulocyte-colony stimulating factor treatment during in vitro culture on

- porcine pre-implantation embryos. PLOS ONE 15:e0230247. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0230247>
68. Yin S-Y, Sun B-M, Xu T, Liu X, Huo L-J, Zhang X, Zhou J, Miao Y-L (2020) CHIR99021 and rpIL6 promote porcine parthenogenetic embryo development and blastocyst quality. *Theriogenology* 158:470–476. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2020.08.007>
 69. Adverse effect of IL-6 on the in vitro maturation of porcine oocytes. <http://kjoas.apub.co.kr/articles/article/bxzQ/#Information>. Accessed 20 Oct 2024
 70. Interleukin-6 stimulates in vitro development of late-stage ovine embryos - ScienceDirect. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S016503782300339X?via%3Dihub>. Accessed 20 Oct 2024
 71. Craft WA (1958) Fifty Years of Progress in Swine Breeding. *Journal of Animal Science* 17:960–980. <https://doi.org/10.2527/jas1958.174960x>
 72. Use of gene-editing technology to introduce targeted modifications in pigs | Journal of Animal Science and Biotechnology | Full Text. <https://jasbsci.biomedcentral.com/articles/10.1186/s40104-017-0228-7>. Accessed 21 Oct 2024
 73. Zhang J, Khazalwa EM, Abkallo HM, Zhou Y, Nie X, Ruan J, Zhao C, Wang J, Xu J, Li X, Zhao S, Zuo E, Steinaa L, Xie S (2021) The advancements, challenges, and future implications of the CRISPR/Cas9 system in swine research. *Journal of Genetics and Genomics* 48:347–360. <https://doi.org/10.1016/j.jgg.2021.03.015>
 74. Czaja W, Nakamura YK, Li N, Eldridge JA, DeAvila DM, Thompson TB, Rodgers BD (2019) Myostatin regulates pituitary development and hepatic IGF1. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* 316:E1036–E1049. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00001.2019>
 75. Qian L, Tang M, Yang J, Wang Q, Cai C, Jiang S, Li H, Jiang K, Gao P, Ma D, Chen Y, An X, Li K, Cui W (2015) Targeted mutations in myostatin by zinc-finger nucleases result in double-muscle phenotype in Meishan pigs. *Sci Rep* 5:14435. <https://doi.org/10.1038/srep14435>
 76. Wang K, Tang X, Xie Z, Zou X, Li M, Yuan H, Guo N, Ouyang H, Jiao H, Pang D (2017) CRISPR/Cas9-mediated knockout of myostatin in Chinese indigenous Erhualian pigs. *Transgenic Res* 26:799–805. <https://doi.org/10.1007/s11248-017-0044-z>
 77. Paek H-J, Luo Z-B, Choe H-M, Quan B-H, Gao K, Han S-Z, Li Z-Y, Kang J-D, Yin X-J (2021) Association of myostatin deficiency with collagen related disease-umbilical hernia and

tippy toe standing in pigs. *Transgenic Res* 30:663–674. <https://doi.org/10.1007/s11248-021-00275-6>

78. Berg F, Gustafson U, Andersson L (2006) The Uncoupling Protein 1 Gene (UCP1) Is Disrupted in the Pig Lineage: A Genetic Explanation for Poor Thermoregulation in Piglets. *PLOS Genetics* 2:e129. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.0020129>

79. Zheng Q, Lin J, Huang J, Zhang H, Zhang R, Zhang X, Cao C, Hambly C, Qin G, Yao J, Song R, Jia Q, Wang X, Li Y, Zhang N, Piao Z, Ye R, Speakman JR, Wang H, Zhou Q, Wang Y, Jin W, Zhao J (2017) Reconstitution of UCP1 using CRISPR/Cas9 in the white adipose tissue of pigs decreases fat deposition and improves thermogenic capacity. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 114:E9474–E9482. <https://doi.org/10.1073/pnas.1707853114>

80. Commins SP, Jerath MR, Cox K, Erickson LD, Platts-Mills T (2016) Delayed anaphylaxis to alpha-gal, an oligosaccharide in mammalian meat. *Allergology International* 65:16–20. <https://doi.org/10.1016/j.alit.2015.10.001>

81. Wilson J, Erickson L, Levin M, Ailsworth S, Commins S, Platts-Mills T (2024) Tick bites, IgE to galactose-alpha-1,3-galactose and urticarial or anaphylactic reactions to mammalian meat: The alpha-gal syndrome. *Allergy* 79:. <https://doi.org/10.1111/all.16003>

82. Commissioner O of the (2020) FDA Approves First-of-its-Kind Intentional Genomic Alteration in Line of Domestic Pigs for Both Human Food, Potential Therapeutic Uses. In: FDA. <https://www.fda.gov/news-events/press-announcements/fda-approves-first-its-kind-intentional-genomic-alteration-line-domestic-pigs-both-human-food>. Accessed 21 Oct 2024

83. Chuang C-K, Chen C-H, Huang C-L, Su Y-H, Peng S-H, Lin T-Y, Tai H-C, Yang T-S, Tu C-F (2017) Generation of GGTA1 Mutant Pigs by Direct Pronuclear Microinjection of CRISPR/Cas9 Plasmid Vectors. *Animal Biotechnology* 28:174–181. <https://doi.org/10.1080/10495398.2016.1246453>

84. Tu C-F, Chuang C, Yang T-S (2022) The application of new breeding technology based on gene editing in pig industry — A review. *Anim Biosci* 35:791–803. <https://doi.org/10.5713/ab.21.0390>

85. Ali A, Kemter E, Wolf E (2024) Advances in Organ and Tissue Xenotransplantation. *Annu Rev Anim Biosci* 12:369–390. <https://doi.org/10.1146/annurev-animal-021122-102606>

86. Moazami N, Stern JM, Khalil K, Kim JJ, Narula N, Mangiola M, Weldon EP, Kagermazova L, James L, Lawson N, Piper GL, Sommer PM, Reyentovich A, Bamira D, Saraon T, Kadosh BS, DiVita M, Goldberg RI, Hussain ST, Chan J, Ngai J, Jan T, Ali NM, Tatapudi VS, Segev DL, Bisen S, Jaffe IS, Piegari B, Kowalski H, Kokkinaki M, Monahan J, Sorrells L, Burdorf L, Boeke JD, Pass H, Goparaju C, Keating B, Ayares D, Lorber M,

Griesemer A, Mehta SA, Smith DE, Montgomery RA (2023) Pig-to-human heart xenotransplantation in two recently deceased human recipients. *Nat Med* 29:1989–1997. <https://doi.org/10.1038/s41591-023-02471-9>

87. Xu H, He X (2024) Developments in kidney xenotransplantation. *Front Immunol* 14:. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1242478>

Melléklet