

**Állatorvostudományi Egyetem**  
**Állatorvostudományi Doktori Iskola**

**Stressz-előkezelés – új módszer az asszisztált  
reprodukciós eljárások sikerességének növelésére**

PhD értekezés tézisei

Dr. Losonczi Eszter

2019

Témavezető:

.....

Dr. Pribenszky Csaba

Állatorvostudományi Egyetem

Állathigiéniai, Állomány-egészségtani Tanszék és Mobilklinika

.....

Dr. Losonczy Eszter



## TARTALOM

1. Bevezetés és az értekezés célkitűzései .....	5
2. Anyag és módszer .....	7
2.1. A petesejtek és embriók előállításának módja.....	7
2.2. Az embriók tenyésztése.....	7
2.3. PTAT kezelés .....	7
2.4. A zebradánió embriók hűtve tárolása.....	8
2.5. A PTAT-kezelt embriókból keletkezett kifejlett halak ívatása.....	8
2.6. Vitifikáció és felmelegítés .....	8
2.7. Az egér petesejtek <i>in vitro</i> fertilizációja .....	8
2.8. Egér petesejtek parthenogenetikus aktiválása .....	8
2.9. A blasztociszta sejtszám meghatározása .....	9
2.10. Egér embrió átültetés.....	9
2.11. Génexpressziós vizsgálatok .....	9
3. Eredmények.....	10
3.1. A stresszel szembeni tolerancia vizsgálata .....	10
3.2. A stressz-előkezelés hosszú távú hatásainak vizsgálata .....	10
3.3. A PTAT alkalmazása zebradánió embriók hűtve tárolásához .....	11
3.4. A PTAT alkalmazása egér petesejtek vitifikációjához .....	11
3.5. A génexpresszió változásai a PTAT hatására.....	12
4. Megbeszélés.....	13
5. Új tudományos eredmények.....	16
6. Publikációs lista .....	17
6.1. Az értekezés témájában megjelent tudományos publikációk .....	17
6.2. Konferenciaközlemények, előadások.....	17
7. Köszönetnyilvánítás .....	19

## 1. BEVEZETÉS ÉS AZ ÉRTEKEZÉS CÉLKITŰZÉSEI

Természetes körülmények között az emlősök ivarsejtjei és embriói az egyed ivarszervei által biztosított védett környezetben keletkeznek, fejlődnek, és látják el feladataikat. Azonban az utóbbi nagyjából ötven évben számos olyan biotechnológiai eljárás került kidolgozásra, azt követően pedig rutinszerű alkalmazásra is, mely szükségessé teszi ezeknek a sejteknek, szöveteknek az *in vitro* körülmények között való tenyésztését, termékenyítését, vagy mélyhűtését. Ezen eljárások kedvező hatásai (mint például a génmegőrzés, a természetesnél nagyobb számú utód létrehozása, vagy a termékenység megőrzése) ellenére károsíthatják az ivarsejteket, embriókat, mely az embrionális fejlődés elmaradását eredményezheti. Az elmúlt években számos kutatás bizonyította, hogy egy megfelelő időpontban, megfelelő mértékben alkalmazott kontrollált stressz-előkezelés, mint amilyen a hidrosztatikus nyomás stressz-előkezelés is, elősegítheti a sejtek adaptációs képességét, ezáltal ellenállóbbá teheti őket bizonyos beavatkozások, például a mélyhűtés kedvezőtlen hatásaival szemben. Jelen kutatómunka célja az volt, hogy az asszisztált reprodukciós eljárások körében a hidrosztatikus nyomás előkezelés számára új alkalmazási területeket fedezzen fel.

A tanulmányban a „stressz”, „stressz-előkezelés” kifejezést a kutatások kezdeti szakaszában végzett kezelésekre használok, melyek során a sejt- és azon belül is fajspecifikus, optimális mértékű stressz-előkezelést még nem sikerült meghatározni. Amikor az optimális hatással bíró stressz-előkezelés paraméterei már meghatározásra kerültek, az eljárást PTAT-nek nevezem, a Pressure Triggered Activation of Tolerance, (nyomás által kiváltott ellenállóképesség növekedés) kifejezés alapján.

A PTAT alkalmazásának egy lehetséges területe a zebradánió embriók mélyhűtése, vagy hűtve tárolása. A zebradánió egy széles körben használt modellállat számos tudományterület, többek között a fejlődéstan, genetika, élettan, toxikológia, környezetbiológia területein. Bár a különböző kutatásokhoz használt genetikailag módosított vonalak száma nőttön-nő, a nagy genetikai variabilitás megőrzésére érdekében az embriók mélyhűtését célzó erőfeszítések ezidáig nem jártak sikerrel. E sikertelenség főbb okai az embriókat körülvevő kevésbé permeábilis chorion burok, az embriók nagyfokú érzékenysége a hűtéssel szemben, valamint az embriókat alkotó szik és az osztódó sejtek eltérő kémiai tulajdonságai, és ebből fakadóan ellentétes viselkedése a víz- és a krioprotektánsok felvétele kapcsán. A mélyhűtési próbálkozások eredménytelensége miatt számos kutatás célozza meg az embriók hűtve tárolását, mely az első fontos lépés lehet ebben az irányban, azonban e területen sem tud egyetlen tanulmány sem tartós túlélésről beszámolni. A PTAT alkalmazásával a sejteket prekondicionálhatjuk, felkészíthetjük egy későbbi károsító beavatkozásra, amilyen például a

mélyhűtésből fakadó mechanikus, ozmotikus vagy a krioprotektánsok alkalmazása miatti toxikus hatások. A zebradániókon végzett kísérlet során azt vizsgáltuk, hogy a PTAT kezelés segítségével növelhető-e az embriók hűtéssel szembeni ellenállóképessége, és ennek kapcsán a kikelés utáni túlélése. Ezen kívül azt is feltételeztük, hogy a PTAT kezeléssel átesett embriók a hűtve tárolás után képesek ivarérett, normális szaporodóképességű halakká fejlődni.

A PTAT egy másik lehetséges alkalmazási területe a humán petesejt vitrifikáció hatékonyságának növelése. Mind a sperma-, mind pedig az embriómélyhűtés rutin eljárásnak számítanak a humán asszisztált reprodukciós kezelések során. Az embriók mélyhűtése azonban számos országban etikai, erkölcsi, törvényi szabályozásbeli vitákat gerjesztett, melyek következtében korlátozták, vagy akár meg is tiltották ezt a beavatkozást. Ezekben az országokban ennek alternatívájaként csak a petesejtek mélyhűtése alkalmazható a petefészek stimulációs ciklusok maximális kihasználása érdekében. Emellett a petesejtek mélyhűtésére onkológiai kezeléseket megelőzően, a termékenység megőrzése céljából is szükség lehet. Azonban a petesejtek sikeres mélyhűtését számos, a sejtek speciális struktúrájából fakadó tényező nehezíti: nagy a térfogatuk, de a térfogathoz képest kis felülettel rendelkeznek, magas a víztartalmuk, hűtéssel szemben igen érzékenyek, a magorsófonalak és a membránok nagyon sérülékenyek, a plazmamembrán vízzel és a krioprotektánsokkal szembeni permeabilitása kedvezőtlen. Mindezen akadályok leküzdésére többféle lassú mélyhűtési és vitrifikációs protokoll is kidolgozásra került, kedvező, de a PTAT segítségével talán tovább tökéletesíthető eredményekkel. Jelen tanulmányban egér modellen alkalmaztuk a PTAT kezelést a petesejt vitrifikációt megelőzően.

A kutatás utolsó fázisában a PTAT hatásmechanizmusára igyekeztünk fényt deríteni génexpressziós vizsgálatokkal. Először petesejteken végeztük el ezt a mérést, hogy megismerjük a PTAT után azonnal jelentkező változásokat. Mivel az egér embriókban az embrionális genom a kétsejtes stádiumban aktiválódik, és csak ekkor kezdődik meg a *de novo* RNS szintézis, feltételeztük, hogy a petesejtekben a PTAT hatása csak később lesz tetten érhető. Ezért a petesejtek PTAT kezelése, majd intracitoplazmatikus spermium injektálással való termékenyítése után négysejtes állapotban ismét tanulmányoztuk a génexpresszió változásait a teljes egérgenomra kiterjedő microarray vizsgálat segítségével.

## 2. ANYAG ÉS MÓDSZER

### 2.1. A petesejtek és embriók előállítása

Az egér petesejtek és embriók termeléséhez nőivarú egereket szuperovuláltattunk PMSG, majd 48 órával később hCG injekció intraperitoneális alkalmazásával. A petesejteket a hCG injekció utáni reggelen a nőtény egerek petevezetőiből mostuk ki. Embriók kinyeréséhez a hCG injekció után a nőtény egereket hímekkel raktuk közös ketrecbe, és másnap délelőtt a zigótákat a pározott nőtények (ezt a hüvelydugó jelenléte alapján bíraltuk el) petevezetőiből mostuk ki. A kétsejtes embriók és az *in vitro* fejlődött blasztociszták ezen egysejtes embriókból keletkeztek *in vitro* tenyésztést követően.

Az *in vivo* fejlődött blasztociszták kinyeréséhez a kompaktált morula vagy korai blasztociszta állapotú embriókat a hCG injekció után 3.5 nappal nyertük ki a pározott nőtény egerek méhéből, majd 4–24 órán át tenyésztettük őket *in vitro*, amíg elérték az expandált blasztociszta állapotot.

A zebradánió embriók termeléséhez a szülőket dupla ívató edénybe helyeztük 15–16 órával az ívatást megelőzően, melyben a hímeket és a nőtényeket átlátszó, kivethető válaszfal választotta el. Az ívás idejére a falat eltávolítottuk, és az ikrák a belső tartály perforált alján keresztül a külső tartályba hullottak. Ezt követően a belső tartály kiemelésével a halakat eltávolítottuk, a külső tartály vizét pedig átszűrtük, hogy kinyerjük az embriókat.

### 2.2. Az embriók tenyésztése

Az egér embriók tenyésztése 30 µl-es KSOM+AA (EmbryoMax, Millipore, USA) tenyésztőoldatban, ásványi olajjal (Ovoil, Vitrolife, Svédország) fedve, 37°C-on, 6% CO<sub>2</sub>-ot tartalmazó 90% páratartalmú inkubátorban történt. Az embriók fejlődését naponta ellenőriztük sztereomikroszkóp segítségével.

A zebradánió embriókat 26°C-os rendszervízben tenyésztettük. Az 5. naptól az ivadékokat naponta egyszer etettük banánféléreggel és a rendszervízbe adagolt SDS 100 haltáppal. Az embriók és ivadékok fejlődését naponta ellenőriztük sztereomikroszkóppal; az elhullásokat és az esetleges fejlődési rendellenességeket feljegyeztük. A 15. napon az ivadék csoportokat az állatház 3,5 l-es tenyésztő tartályaiba telepítettük.

### 2.3. PTAT kezelés

A PTAT kezelést megelőzően az egér petesejteket és embriókat G-MOPS Plus (Vitrolife, Svédország) oldattal 0,25 ml-es műszalmába (IMV, Franciaország), a zebradánió embriókat pedig rendszervízzel 2 ml-es Luer-lock fecskendőkhöz (BBraun, Németország) töltöttük. A

szalmákat műanyag dugóval, a fecskendőket Luer-lock kupakkal zártuk le, levegő buborékoktól mentesen.

A PTAT kezelések egy számítógép által vezérelt, hidrosztatikus nyomáskezelésre kifejlesztett eszközben, a GBOX 2010-ben (Applied Cell Technology, Hungary) kerültek kivitelezésre. A nyomáskamrát előzetesen desztillált vízzel feltöltöttük, melyet az eszköz a beállított hőmérsékletre felmelegített. A mintatárolók nyomáskamrába helyezése után a kamrát lezártuk, és a beállított paramétereknek megfelelően a kezelést a GBOX 2010 elvégezte.

#### **2.4. A zebradánió embriók hűtve tárolása**

A hűtve tárolást Desai és munkatársai (2015) módosított protokollja alapján végeztük. Az embrió csoportokat 10 ml hűtő oldattal (rendszer vízből készített 1M-os metanol és 0,1M-os szacharóz oldat) 50 ml-es csavaros centrifuga csövekben jégre helyeztük 24 órára. Ennek leteltével az embriókat egy szűrő segítségével kb 30 mp-en keresztül rendszer vízzel átmostuk. Ezután az embriókat 10 cm-es Petri csészékbe helyeztük, és a továbbiakban a korábban leírtaknak megfelelően tenyésztettük őket.

#### **2.5. A PTAT-kezelt embriókból keletkezett kifejlett halak ívatása**

Az ivarérett halakká fejlődött, PTAT kezelésen átesett korábbi embriókat az egyedek nyomon követhetősége érdekében leopárd dánióval (*Danio rerio var. frankei*) pároztattuk, majd a halakat eltávolítottuk az ívató edényből, és az embriókat 10 napon keresztül tenyésztettük. Az ívatás és az embriók tenyésztése a korábban leírt módon történt.

#### **2.6. Vitrifikáció és felmelegítés**

Az egér petesejteket a Cryotop módszerrel vitrifikáltuk, a Kitazato Biopharma által javasolt protokoll szerint (Kuwayama, 2005).

#### **2.7. Az egér petesejtek *in vitro* fertilizációja**

Annak érdekében, hogy az egér petesejtek fejlődésre való képességét vizsgáljuk, a petesejteket intracitoplazmatikus spermium injektálással termékenyítettük, Kuretake és munkatársai (1996) módszerének megfelelően. A spermium fej petesejtbe injektálása után a sejteket 6–8 órán keresztül KSOM+AA tenyésztőoldatban inkubáltuk. Ezt követően ellenőritük a petesejteket, és a két pronucleusszal valamint második sarki testtel rendelkező zigótákat tenyésztettük tovább a korábban ismertetett módon.

#### **2.8. Egér petesejtek parthenogenetikus aktiválása**

Bizonyos kísérletekben az *in vitro* fertilizáció alternatívájaként parthenogenetikus aktiválást alkalmaztunk a petesejtek fejlődési képességének vizsgálatára. Az aktiválást a hCG injekció



beadását követően 17 órával kezdtük meg. Az összegyűjtött petesejteket először G-MOPS Plus-ból készített 10 µm-os oldatba helyeztük, majd KSOM+AA-ból készített 5mM-os DMAP oldatban inkubáltuk 3 órán keresztül. Az aktiválás után a petesejteket a korábban leírtak szerint tenyésztettük.

## **2.9. A blasztociszta sejtszám meghatározása**

A blasztociszták teljes sejtszámát és az embriócsomó sejtszámát egy differenciáló festési eljárással határoztuk meg. Az embriócsomó sejtszámához elsődleges ellenanyagként anti-OCT4-et (Polyclonal Rabbit 19081, Santa Cruz Biotechnology) alkalmaztunk, melyhez a másodlagos ellenanyag és az ehhez kötött festék (Alexa Fluor 594 anti-rabbit) Molecular Probes, USA) kötődött. Ezután a blasztociszták teljes sejtszámát DAPI-t (Sigma-Aldrich, USA) tartalmazó Vectashield (Vector Laboratories, USA) segítségével festettük meg.

A megfestett sejtek számát különböző fókuszsíkokon készített digitális fotók segítségével határoztuk meg. Az ICM sejtek pirosan fluoreszkáltak az Alexa fluor 594-nek köszönhetően, míg a DAPI kék fluoreszcenciával jelölte meg az összes sejt sejtmagjában található DNS-t.

## **2.10. Egér embrió átültetés**

Az embriótranszferhez szükséges álvemhes nőtény egereket vazektomizált hímekkel való párosztatás segítségével állítottuk elő. A pázott, azaz hüvelydugót prezentáló nőtények petefészkeit, petevezetőit, és a méhszarv végét óvatosan kiemeltük a hasüregből általános anesztéziában. A petevezetőn apró 27 G-s tűvel apró szúrást ejtettünk, melyen keresztül egy finom üvegpipetta segítségével az üregbe juttattuk az embriókat. A petevezető és a petefészek visszahelyezése után zártuk a hasüreget.

## **2.11. Génexpressziós vizsgálatok**

RNeasy Plus Micro Kit (Qiagen, Hilden, Germany) segítségével végeztük el az RNS izolálást. Kétkörös RNS amplifikációval állítottuk elő a szükséges mennyiségű c-RNS-t. CyDye Post-Labeling Reactive Dye Pack (GE Healthcare, Waukesha, WI, USA) alkalmazása után a kapott terméket Agilent 4 X 44K teljes egér genomot vizsgáló chipre (GPL4134; Agilent Technologies) hibridizáltuk.

Az izolált RNS-t reverz transzkripciónak vetettük alá SuperScript VILO cDNA Synthesis Kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) segítségével, és így c-DNS-t szintetizáltunk, a gyártó utasításainak megfelelően. A primerek optimalizációját követően 12 gént a petesejtes, és 8 gént a négysejtes embriók vizsgálatához kiválasztottunk, melyeket valós idejű polimeráz láncreakció alkalmazásával verifikáltunk.

### 3. EREDMÉNYEK

#### 3.1. A stresszel szembeni tolerancia vizsgálata

Ezen kísérletek célja az volt, hogy meghatározzuk a vizsgált minták stressztolerancia határát, azaz azt a hidrosztatikus nyomás értéket, melyet a petesejtek, embriók még irreverzibilis károsodás nélkül képesek átvészelni. E célból a célsejteket (egér petesejteket, egér kétsejtes, *in-vitro*- és *in-vivo*-fejlődött blasztocisztákat, valamint 4-, 24-, és 48-órás zebradánió embriókat) különböző mértékű stressz-előkezelésnek tettünk ki különböző hosszúságú időtartamokra, és ezt követően vizsgáltuk a megfigyelhető morfológiai változásokat és a fejlődésre való képességüket. Ezeknek a kísérleteknek a segítségével határoztuk meg a későbbi kísérletekben alkalmazott PTAT kezelés paramétereit, mely kezelés hatásait aztán egyéb rutin beavatkozásokat (pl. vitrifikáció, *in vitro* fertilizáció, hűtve tárolás) követően vizsgáltuk.

Az eredmények azt mutatták, hogy az embriók stressz-előkezeléssel szembeni toleranciája függ az embrió fejlődési stádiumától. A kezelések hatására reverzibilis morfológiai eltérések voltak megfigyelhetőek, a blasztociszták ürege összeesett, illetve a blasztomerek mérete lecsökkent. Mindegyik vizsgált mintatípusban sikeresen meghatározásra került az optimális hatású kezelés erőssége, időtartama, és hőmérséklete. A későbbi kísérletekben az itt meghatározott paraméterekkel végeztük el a kezelést a hosszú távú hatások vizsgálatakor, a zebradánió embriók hűtve tárolását és az egér petesejtek vitrifikációját megelőzően, valamint a génexpressziós vizsgálatok során is.

#### 3.2. A stressz-előkezelés hosszú távú hatásainak vizsgálata

A kutatómunkának ebben a szakaszában azt vizsgáltuk, hogy a stressz-előkezelés hosszabb távon hatással van-e az életképességre. E célból a hosszabb távú *in vitro* fejlődést, az implantációt, az élettartamot, és a szaporodásra, egészséges utód létrehozására való képességet vizsgáltuk PTAT-kezelt zebradánió embriók, valamint PTAT-kezelt, majd recipiensbe ültetett egér blasztociszták esetében.

A zebradánió embrióknál a szubletális mértékű stressz-előkezelést követően a kontrollhoz hasonló kikelési arányt, túlélési arányt, valamint normál morfológiát tapasztaltunk a fertilizációt követő 30 napos megfigyelési időszakban. A stressz-előkezelésen átesett egér blasztociszták recipiensbe ültetését követően egészséges újszülöttek keletkeztek, melyek az ivarérés után szaporodásra képesek voltak, élettartamuk nem különbözött a kontrollokétól, és egészséges utódaik születtek. Ehhez hasonló, a hosszú távú hatásokat vizsgáló kísérleteket a kutatómunka későbbi szakaszaiban is elvégeztünk, ekkor már a PTAT hatásait és egyéb

eljárások (hűtve tárolás, vitrifikáció, intracitoplazmatikus spermium injektálás, stb.) együttes hatásait vizsgáltuk.

### 3.3.A PTAT alkalmazása zebradánió embriók hűtve tárolásához

Az eddigi kísérletek folytatásaként a már meghatározott mértékű stressz-előkezelést – vagy más szóval PTAT (Pressure Triggered Activation of Tolerance, azaz nyomás által kiváltott ellenállóképesség növekedés) kezelést – a zebradánió embrió hűtve tárolás folyamatába illesztettük, melynek során az embriókat 0°C-on tartottuk 24 órán keresztül. A túlélési arányt, a fejlődésre való képességet, valamint a fejlődő embriók morfológiáját vizsgáltuk a PTAT hatásának értékelése érdekében. Ezen kívül egy további, a hosszú távú hatásokat feltárására irányuló vizsgálatot is végeztünk, melynek során a PTAT-kezelt, majd hűtve tárolt embriókat az ivarérettség eléréséig felneveltük, és a szaporodóképességüket vizsgáltuk.

PTAT-kezelt zebradánió embriók a hűtve tárolást (24 óra, 0°C-on) szignifikánsan magasabb arányban voltak képesek túlélni (kikelési arány a 6. napon  $37.6 \pm 3.4\%$  vs.  $23.0 \pm 3.8\%$ ; szívverést mutató lárvák aránya  $17.1 \pm 3.5\%$  vs.  $4.3 \pm 1.7\%$ ; PTAT vs. Control, sorrendben). Emellett a PTAT-kezelt csoportban magasabb arányban fordultak elő morfológiailag ép egyedek ( $42.5 \pm 23.7\%$  vs.  $22.1 \pm 14.3\%$ ; PTAT vs. Control). Míg a kezeletlen embriók mind elpusztultak a fertilizációt követő 30. napon, a PTAT-kezelt csoport tagjai képesek voltak elérni a párosodáshoz szükséges életkort (~90–120 days), és egészséges utódokat létrehozni.

### 3.4. A PTAT alkalmazása egér petesejtek vitrifikációjához

A kutatómunka következő fázisában a korábban meghatározott mértékű PTAT kezelést az egér petesejtek vitrifikációs protokolljába illesztettük be. A kezelés után a petesejteket vitrifikáltuk majd felmelegítettük, intracitoplazmatikus spermium injektálással termékenyítettük, és blasztociszta állapotig tenyésztettük. A vitrifikációt követő és a termékenyítést követő túlélés, a fejlődésre való képesség, valamint a blasztociszta sejtszáma voltak a kísérlet végpontjai. Ezen kívül a PTAT hosszabb távú hatásait is vizsgáltuk: a PTAT kezelt, majd vitrifikált petesejteket *in vitro* termékenyítettük, majd kétsejtes állapotig való *in vitro* tenyésztést követően az embriókat recipiensekbe beültettük, a megszülető utódok egészségi állapotát és élettartamát nyomon követtük, majd pároztattuk őket, és a keletkező következő generációban kerestük az esetleges malformációkat, degeneratív betegségeket.

Egér petesejtek PTAT kezelését követően a vitrifikáció/felmelegítést, valamint a termékenyítést követő túlélési arány hasonló volt, mint a kezeletlen kontrol esetében (80% vs. 76%; és 73% vs. 68%; PTAT vs. Control, sorrendben). Azonban a kezelés kedvező hatásai megmutatkoztak a későbbiekben a petesejtekből fejlődő embriókon, melyek magasabb arányban érték el a kétsejtes és a blasztociszta állapotot (73% vs. 57%; és 60% vs. 50%;

PTAT vs. Control, sorrendben). A kezelés további hatásaként, a PTAT-kezelt petesejtekben fejlődő blasztociszta embriók összes sejt száma és ezen belül is az embriócsomó sejt száma szignifikánsan magasabb volt (50 vs. 45; és 21 vs. 17; PTAT vs. Control, sorrendben). Továbbá, a PTAT-kezelt petesejtekben keletkező kétsejtes embriók szignifikánsan magasabb arányban implantálódtak embrióátültetést követően (27% vs. 12%; PTAT vs. Control), ezáltal bizonyítva a kezelés kedvező hatását az embriók minőségére vonatkozóan. A megszületett következő generáció a kontrollhoz hasonló volt.

### **3.5. A génexpresszió változásai a PTAT hatására**

E kísérlet célja az volt, hogy megfigyeljük, a PTAT hatására milyen változások következnek a beágyazódás előtti embriókban. Először kezeletlen, valamint PTAT-kezelt petesejtekben vizsgáltuk a génexpresszió eltéréseit. Ezután a PTAT kezelés hatásait ezekből a sejtekből intracitoplazmatikus spermium injektálást követően keletkezett négysejtes embriókban vizsgáltuk annak érdekében, hogy megtudjuk, a PTAT milyen transzkripciós változásokat okoz az embrionális genom aktiválódása után.

Az eredmények azt mutatták, hogy a petesejtekben nem okozott transzkripciós szintű változásokat a PTAT kezelés. Azonban az embrionális genom aktiválódása után, négysejtes állapotban jelentős hatásokkal bírt a PTAT kezelés, mely a riboszómák felépítésével és működésével összefüggő gének működésének kifejezett lecsökkenését eredményezte. Ezen eredmények segíthetik a PTAT hatásmechanizmusának megismerését, azonban a komplex folyamatok részletes megértéséhez további vizsgálatokra van szükség.

## 4. MEGBESZÉLÉS

Számos korábbi kutatás eredményei alapján összefoglalható, hogy az ivarsejtek, embriók a PTAT kezelése kedvező hatással bír az asszisztált reprodukciós eljárások hatékonyságára. Jelen kutatás e korábbi eredményeket megerősítette, valamint kimutatta, hogy a PTAT hatással van számos gén expressziójára is.

Petesejtek, hímvarsejtek, embriók, vagy éppen embrionális őssejtek szubletális stresszkezelése megerősíti a sejtek általános ellenállóképességét, melynek eredményeképpen azok mélyhűtést követő túlélése és fejlődésre való képessége jelentősen megemelkedik. Ezen eljárások során egy sejt-specifikus PTAT kezelés kerül alkalmazásra, melynek kidolgozása, az optimális kezelési paraméterek kiválasztása minden sejt esetében egy többlépcsős kutatás eredménye. Jelen kutatómunka első lépése során megvizsgáltuk a célsejtek stressztolerancia határát, azaz megkerestük azt a nyomásértéket, mely még nem okozott irreverzibilis károsodást bennük. Az eredmények a korábbi kutatások eredményeivel összhangban azt mutatták, hogy a hidrosztatikus nyomással szembeni tolerancia függ a célsejtek típusától és fejlődési állapotától, valamint az állatfajtól is.

A tolerancia vizsgálata után azt bizonyítottuk, hogy az előző lépésben megfelelőnek talált stressz-előkezelés hosszabb távon sem károsítja a célsejteket: stressz-előkezelésen átesett egér blasztociszták recipiensbe ültetése normális, egészséges utódokat eredményezett, melyek képesek voltak szaporodni is. Hasonlóképpen, 24-órával a termékenyülés után stressz-előkezelésen átesett zebradánió embriók egészséges egyedekké fejlődtek. Mindezek alátámasztják korábbi kutatások eredményeit, melyek szerint a PTAT-kezelésen átesett friss, illetve mélyhűtött sertés spermával végzett inszeminálásból egészséges malacok születtek. Szintén egészséges malacok születését eredményezte a PTAT-kezelt petesejtek segítségével végzett sejtmagátültetési klónozás is. Ezen eredmények alapján a szubletális stressz-előkezelt ivarsejtek, embriók egészséges utódokat eredményezhetnek.

Bár az ivarsejtek, embriók mélyhűtéssel való konzerválása számos fajnál sikeresen alkalmazott eljárás, a zebradánió embriók mélyhűtése mind a mai napig nem járt eredménnyel, számos különböző technika alkalmazása ellenére sem. A lassú mélyhűtés sikertelenségének oka az intracelluláris jégkristály képződés, melyen nem segít a krioprotektánsok, vagy az akvaporinok (szelektív vízcsatornák) alkalmazása sem. Az embriók vitrifikációja számos halfajnál, így a zebradániónál is kipróbálásra került, azonban semelyik tanulmány sem tudott túlélésről, a vitrifikáció utáni fejlődésre való képességről beszámolni. Az embriómélyhűtés sikertelensége miatt a kutatócsoportok inkább az embriók hűtve tárolása felé fordultak, mely eljárás talán a mélyhűtés felé vezető út első lépése lehet. A hűtve tárolás

technikája szintén tökéletesítésre szorul: bár többféle hőmérséklet és időtartam kipróbálásra került már, semelyik esetben sem sikerült kielégítő túlélést és kikelési arányt elérni.

A jelen kutatómunka eredményei azt mutatják, hogy a PTAT technológia javított a hűtve tárolt zebradánió embriók minőségén. A PTAT-kezelt embriók 0°C-on 24 órán át tartó hűtve tárolást követően jelentősen magasabb túlélési arányt mutattak, és magasabb arányban voltak képesek a további fejlődésre, és közöttük nagyobb arányban voltak normál morfológiájú embriók. Korábbi kutatások nem eredményeztek megfelelő hűtve tárolás utáni túlélést sem zebradánió, sem más halfajok esetében. Azonban, a PTAT kezelés hatására a hűtve tárolt embriókból fejlődő egyedek el tudták érni az ivarérett kort, képesek voltak a szaporodásra, és ezáltal saját örökítőanyaguk továbbadására a következő generációnak. Ezek alapján összefoglalható, hogy a PTAT előkezelés jelentős előrelépést eredményezett a zebradánió embriók hűtve tárolásában, lehetővé tette a PTAT-kezelt embriók hosszú távú túlélését, ezáltal lehetőséget biztosítva a zebradánió embriók laboratóriumok közötti egyszerűbb szállítására és a génmegőrzésre. Ezen felül, mivel az embriók fejlődése szünetel a hűtve tárolás ideje alatt, e módszer segítségével késleltethető, szinkronizálható az embriók fejlődése.

A humán petesejtek mélyhűtése az embriók mélyhűtésének alternatívájaként használható egyes országokban etikai, erkölcsi, törvényi szabályozásbeli okok miatt, mely segítheti a petefészek stimulációs ciklusok maximális kihasználhatóságát, valamint a daganatos betegek termékenységének megőrzését. Jelen kutatás során a humán meddőségi centrumokban használatos eljárások alkalmazásával egy több lépésből álló kísérletsorozatot hajtottunk végre egér petesejteken. A kutatás végpontjainak későbbre helyezésével a petesejteken végzett beavatkozások hosszabb távú hatásait és biztonságosságát is vizsgáltuk.

A kezeletlen és PTAT-kezelt egér petesejtek vitrifikációt követő túlélése nem különbözött, bár számszerű eltéréseket már itt is tapasztaltunk a kezelt csoport javára. A további fejlődés során azonban a kétsejtes embriók aránya, a blasztociszták aránya, a blasztociszták embriócsomóját alkotó sejtek száma, és ami mind közül a legfontosabb, az embriótranszfert követően a megszületett utódok aránya szignifikánsan magasabb volt a vitrifikációt megelőzően PTAT-kezelésen átesett petesejtekből fejlődő embriók esetében. Az eredmények összefoglalva azt mutatták, hogy a petesejtek kezelése esetében a PTAT kezelés kedvező hatása az embrionális fejlődés során egyre jelentősebb lesz. A kezeletlen és PTAT-kezelt petesejtekből a vitrifikáció és felmelegítés, majd a termékenyítés után keletkező kétsejtes embriók recipiensbe ültetését követően az utódokat felneveltük, nyomon követtük az élettartamukat, valamint pároztattuk őket. A következő generáció élettartama, egészségi állapota, és szaporodásra való képessége a kezeletlen kontrollokétól nem különbözött. Bár a vizsgált állatok száma nem teszi lehetővé az utódok egészségének, életképességének

mélyebb összehasonlítását, a kezelt csoportban az embrionális fejlődés során mindvégig tetten érhető előnyök későbbi életkorban való vizsgálata céljából a kísérlet nagyobb létszámú mintán való megismétlését tervezzük. Mindezen eredmények alapján a PTAT kezelés a későbbiekben talán a humán petesejtek vitrifikációs protokolljába is beilleszthető lesz, a meddőségi kezelések hatékonyságának növelése, és a termékenység megőrzése céljából.

A kezeletlen és PTAT-kezelt egér petesejtek, és a termékenyítés után belőlük fejlődő négysejtes embriók génexpressziós vizsgálatai eltérő eredményeket hoztak. A PTAT kezelés nem okozott azonnal detektálható változásokat a petesejtek transzkriptumában, ezzel szemben az e sejtekből fejlődő négysejtes embriók génexpressziójában a kezeletlen és a kezelt petesejtekből fejlődő embriók között jelentős különbségek voltak mérhetőek. Hogy betekintést nyerjünk a változásokat okozó molekuláris szintű mechanizmusokba, megvizsgáltuk, hogy a megváltozott működésű gének milyen funkcióval bírnak a sejtekben. A vizsgálat azt mutatta, hogy nagyszámú, a transzláció folyamatával összefüggő gén működése mutatott változást, mely változás az esetek túlnyomó többségében az expresszió csökkenése volt. Ez a masszív csökkenés azt sugallja, hogy a PTAT hatására a riboszómák összeszerelése, és emiatt a fehérjetermelés is jelentősen lecsökkent a preimplantációs fejlődés során. Ezen eredmények összhangban vannak a baktériumok esetében már leírt jelenséggel, mely szerint magas nyomás hatására a baktériumok riboszómái lebomlanak. Ez az *E. coli*-ban megfigyelt riboszóma disszociáció alacsonyabb nyomás esetében reverzibilis, és a nyomás megszűnése után a fehérjetermelés újra megkezdődik. Mindez alátámasztja jelen tanulmányunk eredményét is, miszerint a petesejtek megfelelően kiválasztott paraméterekkel végzett PTAT kezelése bár átmenetileg csökkent fehérjetermelődést okoz, azonban a belőlük fejlődött embriók fejlődési kompetenciája, a blasztociszták sejtszáma, és a megszületett utódok aránya szignifikánsan magasabb a kezelést nem kapott kontrollokénál. Bár eredményeink bemutatnak egy lehetséges működési mechanizmust, mely közelebb vihet minket ahhoz, hogy megértsük, a PTAT kezelés hogyan fejti ki kedvező hatását, a teljes folyamat megismeréséhez még további vizsgálatokra van szükség.

## 5. ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK

1. Meghatároztuk az egér petesejtek, valamint különböző fejlődési stádiumban levő egér és zebradánió embriók stressz toleranciájának határát
2. Bizonyítottuk, hogy a stressz-előkezelés nem bírt hosszútávú káros hatással az egér petesejtekre, egér és zebradánió embriókra. A kezelt mintákból fejlődő egyedek élettartama, szaporodóképessége, és utódai nem különböztek a kontrolloktól.
3. Igazoltuk, hogy a zebradánió embriók hűtve tárolása előtt elvégzett PTAT kezelés szignifikáns emelkedést eredményezett a túlélési és a fejlődési arányban, valamint a fejlődés során a normál morfológiájú embriók arányában. A PTAT kezelés képessé tette a hűtve tároláson átesett embriókat, hogy életben maradjanak az ivarérett korig, szaporodjanak, és egészséges utódokat hozzanak létre.
4. Bemutattuk, hogy az egér petesejtek PTAT kezelése megemelkedett vitrifikációt követő, illetve fertilizációt követő túlélési arányt eredményezett, hatására szignifikánsan megnőtt a kétsejtes, valamint a blasztociszta állapotot elérő embriók aránya. A PTAT-kezelt petesejtekből fejlődő blasztociszták magasabb összes sejtszámmal, és szignifikánsan magasabb embriócsomó sejtszámmal rendelkeztek. A recipiensekbe ültetett kétsejtes embriók szignifikánsan magasabb arányban implantálódtak, és okozták életképes utódok születését. A megszületett utódok élettartama és szaporodóképessége nem különbözött a kontrolloktól.
5. Elvégeztük az első átfogó, teljes egérgenomra kiterjedő génexpressziós vizsgálatot az egér petesejtek PTAT-re adott válaszána megismerése céljából. A PTAT kezelés után közvetlenül a petesejtekben nem volt kimutatható változás a kezelés következtében. Azonban az embrionális genom aktiválódása után, négysejtes állapotban a PTAT-kezelt petesejtekből fejlődő embriókban a riboszómák felépítésével és működésével összefüggő génműködések szignifikáns csökkenést mutattak.



## 6. PUBLIKÁCIÓS LISTA

### 6.1. Az értekezés témájában megjelent tudományos publikációk

Bock I., Losonczi E.\*, Mamo, S., Polgar Zs., Harnos A., Dinnyes A., Pribenszky Cs.: Stress tolerance and transcriptional response in mouse embryos treated with high hydrostatic pressure to enhance cryotolerance, *Cryo Letters*, 31(5). 401–12, 2010.

\*Bock. I. and Losonczi E. contributed equally

Faragó B., Kollár T., Szabó K., Budai C., Losonczi E., Bernáth G., Csenki-Bakos Z., Urbányi B., Pribenszky C., Horváth Á., Cserepes J.: Stimulus-triggered enhancement of chilling tolerance in zebrafish embryos, *PLoS One*, 6;12(2):e0171520. 2017.

Bock I., Raveh-Amit, H., Losonczi E., Carstea, A.C., Feher A., Mashayekhi, K., Matyas Sz., Dinnyes A., Pribenszky C.: Controlled hydrostatic pressure stress downregulates the expression of ribosomal genes in preimplantation embryos: a possible protection mechanism? *Reprod. Fertil. Dev.*, 28(6). 776–84, 2016.

Pribenszky C., Lin, L., Du, Y., Losonczi E., Dinnyes A., Vajta G.: Controlled stress improves oocyte performance - cell preconditioning in assisted reproduction, *Reprod. Domest. Anim.*, 47(S4). 197–206, 2012.

Losonczi E., Pribenszky C.: Ami nem öl meg, az megerősít - új eljárás az asszisztált reprodukciós technikák hatásfokának növelésére, *Magyar Állatorvosok Lapja*, 138(12). 753–768, 2016.

### 6.2. Konferenciaközlemények, előadások

Losonczi E., Szabó K., Kollár T., Csenki Zs., Gazsi Gy., Horváth Á., Urbányi B., Gyüre Zs., Zsigmond Á., Varga M. et al.: A protocol to arrest zebrafish embryonic development at different stages of ontogeny, 10th European Zebrafish Meeting: Book of abstracts, 439, 2017.

Faragó B., Kollár T., Szabó K., Budai Cs., Losonczi E., Bernáth G., Csenki Zs., Urbányi B., Pribenszky Cs., Horváth Á. et al.: A specific preconditioning technology enables zebrafish embryos to survive 24-hour long chilling on ice, 10th European Zebrafish Meeting: Book of abstracts, 319, 2017.

Losonczi E., Palinkas P., Meresz L., Budai C., Szabo K., Farago B., Pribenszky C.: Higher motility results can be achieved by sublethal PTAT (Pressure Triggered Activation of Tolerance) treatment prior to cryopreservation in bull semen, *Reprod. Dom. Anim.*, 50(S3). 64–65, 2015.

Bock I., Losonczi E., Carstea A.C., Feher A., Dinnyes A., Pribenszky C.: Hydrostatic pressure stress treatment of mouse oocytes influences protein synthesis at the 4-cell stage, *Reprod. Fert. Dev.*, 24(1). 186, 2012.

Pribenszky C., Mátyás S., Losonczi E., Stanca, C., Bock I., Vajta G.: Stress for stress tolerance: improving cell survival by sublethal stress treatment of eggs before vitrification – pilot study, *Fertil. and Steril.* 94:(4). S32, 2010.

Matyas S., Pribenszky C., Kovacs P., Rajczy K., Molnar K., Losonczi E., Molnar M., Kaali S.G., Vajta G.: Preconditioning oocytes by sublethal hydrostatic pressure stress in order to improve cryosurvival – animal models and human application In: Amir Arav (editor) *The 1st International Congress on Controversies in Cryopreservation of Stem Cells, Reproductive Cells, Tissue and Organs.* Pianoro: Medimond Srl., p.B3. 2010.

Bock I., Losonczi E., Mamo, S., Polgar Z., Dinnyes A., Harnos A., Pribenszky C.: Transcriptional response and stress tolerance in high hydrostatic pressure treated mouse embryos. In: *Magyar Genetikusok Egyesülete, Paper PS30.*

Losonczi E.: Fertility results following insemination with sublethal stress treated frozen-thawed boar semen. *Reproduction In Domestic Animals Congress (Divcibare, Serbia), 2012.10.05.*

## 7. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Elsőként témavezetőmnek, Dr. Pribenszky Csabának szeretném megköszönni, hogy bevont sejtet, szövetet stressz-előkezelésével kapcsolatos fejlesztésekbe. Azért is hálával tartozom neki, hogy a tudományos kutatás irányába terelt, valamint, hogy ezután arra ösztönzött, hogy kezdjem meg a PhD tanulmányaimat. Mind a kutatás tervezése, mind a kísérletek kivitelezése, mind pedig az értekezés megírása során értékes, konstruktív javaslataival nem csupán segített, hanem együtt dolgozott velem. A sok tőle kapott támogatást az külön értékessé teszi, hogy az ezzel töltött időt nem egyszer a családjától kellett elvennie.

Külön köszönettel tartozom **Dr. Claudia Stancának** az egér ICSI-kben és az egér embrióátültetésben, valamint **Dr. Bock Istvánnak** a génexpressziós kísérletben nyújtott felbecsülhetetlen segítségéért. **Dr. Dinnyés Andrásnak** azért szeretnék köszönetet mondani, hogy lehetővé tette a kutatás bizonyos szakaszainak az általa vezetett BioTaluntum Kft.-ben való lebonyolítását.

Szintén szeretnék köszönetet mondani **Dr. Urbányi Bélának**, **Dr. Horváth Ákosnak**, **Dr. Kollár Tímeának**, **Dr. Bernáth Gergelynek** és **Dr. Csenki-Bakos Zsoltnak**, a Szent István Egyetem Halgazdálkodási Tanszék dolgozóinak, valamint **Dr. Cserepes Juditnak**, **Dr. Faragó Bernadettnek**, **Dr. Budai Csillának** and **Szabó Katalinnak**, az Applied Cell Technology Kft. dolgozóinak.

Köszönettel tartozom **Dr. Könyves Lászlónak**, az Állatorvostudományi Egyetem Állathigiéniai Tanszék vezetőjének, aki szelíden erőltette, és emellett lehetővé tette, hogy jelen dolgozat elkészüljön.

Végül szeretnék köszönetet mondani a **szüleimnek** és páromnak, **Péternek** a támogatásukért, megértésükért, bátorításukért, mindvégig a PhD tanulmányaim során.